

**Facultad de Ciencias – Universidad de Cádiz**

**Master en Biotecnología**

**Año académico: 2020/2021**

**Determinación del perfil venómico en *Lautoconus ventricosus* (Gastrópoda, Conidae) mediante HPLC/MS**



El presente Trabajo de Fin de Máster (TFM) ha sido elaborado en los Departamentos de Ciencia de los Materiales, Ingeniería Metalúrgica y Química Inorgánica y de Química Orgánica

**Realizado por:**

Hassan Annaz

**Dirigido por:**

Prof. Manuel Jiménez Tenorio

Prof. Juan Carlos García Galindo

## Índice

1.- Resumen.....	1
2.- Abstract.....	2
3. Introducción .....	3
3.1. Características generales de los conos.....	3
3.1.1. Los caracoles conos – El género <i>Conus</i> .....	3
3.1.2. Filogenia .....	3
3.1.3. Morfología de los conos .....	4
3.2. El veneno de los conos .....	5
3.3. Las conotoxinas .....	6
3.3.1. Características bioquímicas. El transcriptoma.....	7
3.3.2. Nomenclatura.....	10
3.3.3. Clasificación farmacológica .....	11
3.3.4 Perspectivas y aplicaciones terapéuticas de las conotoxinas .....	12
3.4. <i>Lautoconus ventricosus</i> (Gmelin, 1791).....	12
4. Objetivos .....	13
5. Materiales y métodos.....	14
5.1. Recolección de muestras .....	14
5.2. Mantenimiento de las muestras .....	14
5.3. El transcriptoma de <i>Lautoconus ventricosus</i> .....	15
5.4. Extracción del veneno .....	16
5.5. Evaluación de los distintos métodos de conservación de las muestras.....	17
5.6. Análisis RP-UPLC/MS.....	18
5.7. Herramientas bioinformáticas para el análisis e identificación del péptidos.....	19
6. Resultados y Discusión .....	23
6.1. Mantenimiento en cautividad de <i>L. ventricosus</i> .....	23
6.2. Muestras para el estudio proteómico del conducto del veneno de <i>L. ventricosus</i> .....	24
6.3. Análisis de la viabilidad de los distintos métodos de conservación del conducto del veneno para el análisis proteómico de conotoxinas .....	25

6.4. Efecto del proceso SPE sobre el contenido y perfil de conotoxinas.....	29
6.5. Estudio de la variabilidad del perfil venómico entre individuos .....	31
6.6. Identificación de conotoxinas a partir de las masas monoisotópicas.....	32
7. Conclusiones .....	35
8. Perspectivas de futuro .....	36
9. Bibliografía.....	37

## 1. RESUMEN

Los caracoles cono son moluscos marinos de la familia *Conidae* divididos en 152 géneros y con casi 1000 especies descritas hasta ahora. Su tamaño puede alcanzar hasta los 30 cm en algunas especies y se alimentan de gusanos, algunas de moluscos o peces. Los conos siempre han fascinado a los coleccionistas por la diversidad de sus conchas, pero el interés de la comunidad científica ha aumentado en gran manera en las últimas décadas con el descubrimiento que poseen un sofisticado sistema de inyección de veneno para capturar a sus presas, formado por una mezcla compleja de compuestos activos consiste en cientos –aunque algunas estimaciones más recientes hablan de miles– de péptidos denominados conotoxinas con unos patrones estructurales bien definidos a través de puentes de disulfuro. La selectividad y el amplio rango de dianas de estas conotoxinas forma una materia prima de un gran potencial para investigar sus potenciales usos farmacéuticos.

El presente trabajo aborda por primera vez el estudio del contenido en conotoxinas del veneno del cono *Lautoconus ventricosus* (Gmelin, 1791). Esta especie es un pequeño cono vermívoro cuya área de distribución se centra en el Atlántico Occidental (Bahía de Cádiz y Norte de África) y el Mediterráneo. Para llevar a cabo el estudio se usaron ejemplares salvajes muestreados en Algarve (Portugal) y mantenidos bajo condiciones controladas en un acuario en las instalaciones del Centro Andaluz Superior de Estudios Marinos (CASEM), sito en Puerto Real. Las condiciones de mantenimiento y alimentación se optimizaron en este trabajo.

Para el análisis proteómico se usaron como punto de partida los conductos del veneno de ejemplares mantenidos en el acuario. Dichos conductos fueron extraídos mediante disección, liofilizados y su contenido en veneno extraído. Durante el transcurso de este trabajo se han analizado, puesto a punto y optimizado los protocolos de conservación y extracción de los conductos de veneno, de los extractos, así como los protocolos de análisis de las conotoxinas. Este protocolo será utilizado para futuros estudios con otras especies de conos.

Por otra parte, se han construido librerías de secuencias de conotoxinas a partir de los transcriptomas y del genoma de *L. ventricosus* publicados recientemente, así como de los transcriptomas de otros conos disponibles en la bibliografía y en las bases de datos. Estas librerías se cruzaron con los resultados de los análisis de UPLC-MS con el fin de identificar perfiles característicos de los componentes de los conductos del veneno extraídos. Para este fin se usaron herramientas bioinformáticas (Conoserver) para identificar *in silico* las conotoxinas comparando las masas monoisotópicas o los patrones de fragmentación con las conotoxinas identificadas en el transcriptoma. Como parte del estudio se exploró la variación de los perfiles

proteómicos en función del método de conservación, del método de extracción del conducto del veneno así como la variación entre individuos.

## 2. ABSTRACT

Cone snails are marine mollusks of the Conidae family divided into 152 genera and with almost 1000 species described so far. Their size can reach up to 30 cm in some species; most of them feed on worms, but some feed on mollusks or fishes. Cones have always fascinated collectors for the diversity and beauty of their shells. However, there has been an increasing interest among scientists starting with the discovery of their capabilities to inject through the injection of a complex mixture of venomous compounds by using a sophisticated injection system similar to a hypodermic syringe. They envenomate their preys using this complex mixture of active compounds consisting of hundreds of peptides bearing disulfide bridges known as conotoxins. The selectivity and wide range of targets of these conotoxins form a very interesting pool of raw material for investigating their potential as pharmaceutical leads.

Herein we present for the first time the proteomic study of the conotoxin content of *Lautoconus ventricosus* (Gmelin, 1791). *L. ventricosus* is a small vermivorous cone snail native to the Mediterranean Sea and nearby Western Atlantic (Bay of Cadiz and North Africa) Ocean. The study was carried out with wild specimens sampled in Algarve (Portugal) and kept under controlled conditions in an aquarium at Centro Andaluz Superior de Estudios Marinos –CASEM– in Puerto Real. The conditions for keeping and maintaining alive the specimens were optimized in this work.

The venom ducts of specimens kept in the aquarium were used as material source for proteomics studies. The venom ducts were obtained by dissection of the live specimens. Later on, the venom ducts were lyophilized and the venom content extracted. Herein we present the results of the optimization process of the protocols for extraction, conservation and analysis of conotoxins. This protocol will be used in future studies with other cone species.

Finally, a library with conotoxin sequences has been built up using as starting material the recently published transcriptomes and genome of *L. ventricosus*, along with the transcriptomes of other cone snails published in the bibliography and web data bases. The results of the UPLC-MS were combined with the above-mentioned libraries in order to identify the characteristic profiles of the components of the venom duct extracts. *In silico* identification of conotoxins was achieved by comparing the monoisotopic masses or the fragmentation patterns using several bioinformatics analysis tools (Conoserver). Studies on the changes in the proteomic profile among individuals, or depending upon the extraction and/or conservation method were also addressed.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Características generales de los conos

##### 3.1.1. Los caracoles Conos – El género *Conus*

Los caracoles cono son moluscos marinos de la familia *Conidae* (Fleming, 1822 *sensu lato*), divididos en 152 géneros y que contienen 918 especies descritas hasta la fecha (Board et al., 2019). Son carnívoros depredadores que paralizan a sus presas (gusanos, otros moluscos o peces) mediante la inyección de veneno a través de un sistema especializado similar a una jeringuilla hipodérmica, formado por su diente radular altamente modificado (Kohn et al., 1989).

Su hábitat se encuentra principalmente en aguas poco profundas y templadas (temperaturas entre 22 y 29 °C), a menudo asociada con arrecifes de coral, siendo especialmente abundantes en la región del Indo-Pacífico (Le Gall et al., 1999). En estos ecosistemas, a veces frecuentan el sustrato de coral muerto, acumulaciones detríticas gruesas o cuencas arenosas (Le Gall, Favreau & Richard, 1999). Sin embargo, son cada vez más frecuentes las especies descritas a mayores profundidades (Puillandre et al., 2015), especialmente en áreas de profundidades superiores a los 100 metros (Favreau et al., 1999), siendo característicos los recolectados a varios cientos de metros de profundidad en la región de Nueva Caledonia y otras áreas de Melanesia (*Profundiconus*).

Los conos también se encuentran en el Atlántico tropical, así como a lo largo de las costas atlánticas africanas y del Mediterráneo, siendo este último el caso de la especie objeto del presente estudio, *Lautoconus ventricosus* (Gmelin, 1791).

##### 3.1.2. Filogenia

Los conos fueron descritos por primera vez por Linneo en 1758 en su décima edición de “Systema Naturae” (Bon, 2000). Según la clasificación de Linneo, los caracoles cono, asignados al género *Conus*, pertenecen al filo *Mollusca* del reino animal y a la clase *Gastropoda*. La familia *Conidae* incluye todas las especies y formas de conos, que junto con otras muchas familias (entre las que se encuentran *Turridae* y *Terebridae*), constituyen la superfamilia *Conoidea*, también conocida como *Toxoglossa* (Puillandre et al., 2008). La superfamilia *Conoidea* es parte del orden *Neogastropoda* que pertenece a la subclase *Prosobranchia* de *Gastropoda* (Peters et al., 2013).

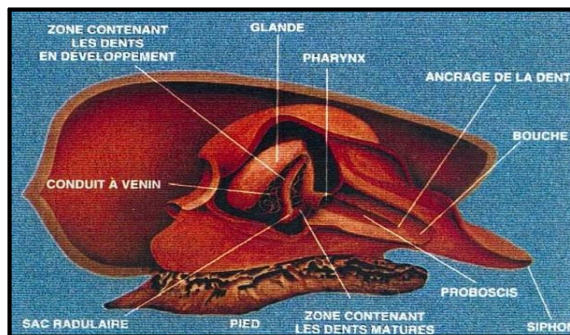
Hasta ahora se han descubierto casi 1000 especies de conos, todas ellas incluidas inicialmente en un único género, el género *Conus* (Terlau & Olivera, 2004). Si bien se han intentado varias subdivisiones de este género basadas en la morfología de las conchas, los estudios más recientes han confirmado la existencia de diferentes subfamilias, géneros y subgéneros en este grupo taxonómico basados en criterios como la morfología del diente radular o, más recientemente, los estudios genómicos (Puillandre et al., 2015;

Tucker & Tenorio, 2013; Tucker & Tenorio, 2009). En el presente trabajo usaremos la clasificación de Tucker & Tenorio (2009) con las actualizaciones taxonómicas en Tucker & Tenorio (2013) y posteriores.

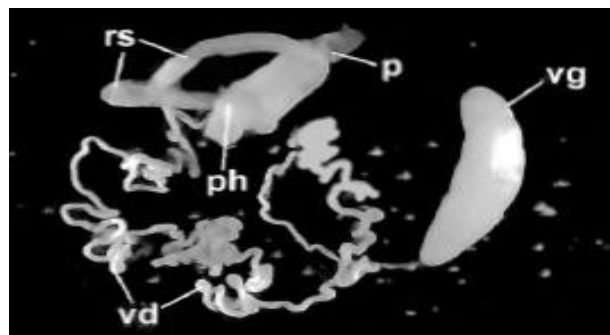
### 3.1.3. Morfología de los conos

Los conos se caracterizan por una amplia variedad de tamaños, formas, patrones y colores que adornan sus conchas. Su tamaño suele estar entre 1 y 20 cm, pudiendo alcanzar hasta los 30 cm en algunas especies, como el cono de África Occidental *Kalloconus pulcher* forma *prometheus*. La concha puede ser cónica, cilíndrica, ovada o bulbosa y forma de 5 a 8 verticilos de piedra caliza que se enrollan de forma dextrógira alrededor de un eje central, la columela. La abertura de la concha es larga y suele ser bastante estrecha.

Los patrones y colores de las conchas son únicos para cada especie, lo que los convierte en criterios importantes, pero a menudo no suficientes, para la clasificación y determinación específica de las especies de conos. La superficie de la concha está generalmente cubierta por una capa fibrosa más o menos gruesa, denominada periostraco (Bon et al., 2000; Goyffon & Heurtault, 1995).



**Figura 1:** Representación esquemática de una sección transversal de un cono.



**Figura 2:** Aparato de veneno de Conidae. Comprende la proboscis (p), la faringe (ph), el saco radular (rs), la glándula del veneno (vg) y el conducto de veneno (vd).

En cuanto a su anatomía (Figura 1), el animal se caracteriza por poseer un pie musculoso que le sirve para arrastrarse por el fondo marino. En su extremo anterior hay un sifón alargado que sirve para respirar y detectar a la presa por quimiotaxis. Justo por debajo, el cono presenta el rostro, que corresponde a la envoltura externa de la boca, la cual puede dilatarse para ingerir a la presa. A cada lado, en la pared del rostro, salen los ojos del cono a través de dos tentáculos finos (Goyffon & Heurtault, 1995). El dispositivo de producción e inyección del veneno de los Conidae consta de cuatro órganos: la glándula del veneno, el conducto del veneno, el saco radular y el complejo faringe-proboscis (Figura: 2).

**1.- La glándula del veneno:** es el órgano más grande del aparato venenoso. Las observaciones histológicas han confirmado la función mecánica de esta glándula, como bomba impulsora del veneno (Le Gall et al., 1999).

**2.- El conducto del veneno:** es el órgano principal del aparato venenoso, ya que es donde se produce el veneno. Se trata de un tubo largo y blanco-amarillento, con una longitud a partir de 4 a 6 cm de largo dependiendo de la especie, y unos cientos de micrómetros de diámetro. (Le Gall et al., 1999). En algunos casos, el conducto puede presentar una coloración distinta en sus extremos proximal y distal.

**3.- El saco radular:** constituye el sistema de inyección del veneno en la presa y su forma de actuación se asemejaría a una jeringuilla hipodérmica. Consta de un brazo corto cuyo extremo frontal emerge del lado derecho de la faringe. Los odontoblastos en la parte inferior del saco radular son los encargados de sintetizar los dientes. Los dientes son inicialmente quitinosos y flexibles, pero luego se endurecen durante su migración del brazo largo al corto (Marsch, 1977). La morfología de los dientes radulares puede variar enormemente entre especies debido a la adaptación a las preferencias de los depredadores (Endean & Rudkin, 1965) y a la estrategia utilizada por cada especie para envenenar a sus presas (Le Gall et al., 1999), constituyendo una característica morfológica distintiva que permite su clasificación filogenética.

**4.- El complejo probóscide-faringe:** se encuentra en el extremo frontal del aparato venenoso de los Conidae. Durante un ataque, el animal invagina el extremo de su trompa hacia abajo hasta la abertura frontal del brazo corto del saco radular para cargar un diente. A continuación, el diente se expulsa en dirección a la presa mediante una rápida devaginación de la probóscide (Le Gall et al., 1999), hincándose en la presa e inyectando el contenido del veneno producido en el conducto gracias al impulso suministrado por la glándula.

### **3.2. El veneno de los conos.**

El inicio del auge de los estudios sobre el veneno de los conos en la década de los 70 fue motivado inicialmente por la constatación del hecho de que las picaduras de los conos podían causar lesiones o muerte a personas (McIntosh et al., 2001; Olivera et al., 2010). A partir de ahí comienza formalmente la investigación sobre la composición y el modo de acción de los componentes de los venenos (Bingham et al., 2010).

Cada especie del género *Conus* produce un veneno distinto de los demás, potente, complejo y rico en péptidos. Los conos utilizan el veneno como un arma poderosa de ataque para compensar su baja velocidad y permitirles, de esa manera, cazar sus presas. Dada la lentitud de estos animales, el veneno posee, asimismo, una velocidad de acción muy rápida para posibilitar que la presa quede paralizada o muerta en



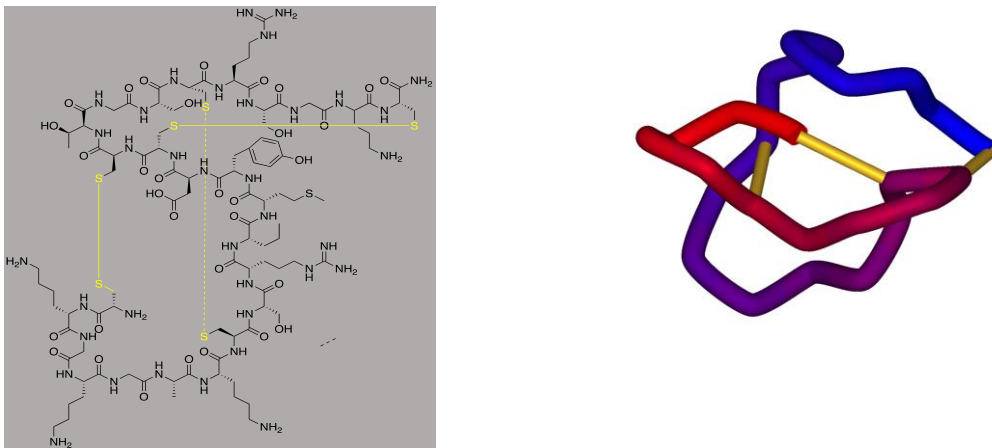
las inmediaciones del depredador. Una de las razones que se esgrimen para justificar la gran diversidad de venenos es el excepcional número de tipos de presas de las que se alimentan los conos, lo que, unido a que cada especie de cono tiene un hábitat con unas características y una red de interacciones ecosistémicas específicas contribuye a explicar por qué cada especie ha desarrollado su propio y amplio repertorio de toxinas (Terlau et al., 2004; McIntosh et al., 2001; Essack et al., 2012; Norton et al., 2006).

El veneno de cada especie contiene, de promedio, más de 100-200 péptidos de pequeño o mediano tamaño conocidos comúnmente como conopéptidos o conotoxinas, con fundamentalmente, poca superposición entre diferentes especies de *Conus*. El término conotoxina se refiere a péptidos ricos en enlaces disulfuro, mientras que conopéptido es un término más general que abarca todos los péptidos que se encuentran en el veneno (Norton et al., 2006; Terlau et al., 2004; Daly et al., 2009). Teniendo en cuenta el número de especies de conos descritas, se calcula que potencialmente pueden existir entre 50.000 y 140.000 componentes farmacológicamente activos en el veneno de las especies del género *Conus* (Olivera, 2006; Olivera et al., 2007). Algunos estudios sugieren que se ha subestimado el número de especies y que el número de péptidos por especie podría ser superior a 1000, lo que daría lugar a una diversidad de péptidos mucho mayor (Kaas et al., 2010). Según otras estimaciones, esta cifra podría incluso superar el millón de componentes (Puillandre et al., 2012).

### 3.3. Las conotoxinas.

Las **conotoxinas** son pequeños péptidos de 8 a 41 aminoácidos que contienen de dos a cinco puentes disulfuro; tienen una estructura muy compacta y, por tanto, son relativamente estables. Estos compuestos se consideran los responsables de la mayoría de los síntomas tóxicos que se observan con el envenenamiento (Favreau et al., 1999). Además de su pequeño tamaño, estos péptidos se distinguen por grandes divergencias en su secuencia, incluso entre conopéptidos homólogos de especies de conos estrechamente relacionados (Terlau et al., 2004; Norton et al., 2006).

En la década de 1970, los estudios de Endean (Endean et al., 1974; Endean et al., 1979) fueron los primeros en implicar a los venenos de caracoles cono como fuentes de nuevos compuestos farmacológicamente activos. Otros estudios pioneros fueron los del grupo del profesor Baldomero Olivera, donde se definieron las secuencias de un gran número de conotoxinas y llevaron a la identificación de una serie de actividades biológicas (Olivera et al., 1985; Olivera et al., 1990), a partir de las cuales quedó claro el potencial de las conotoxinas en el tratamiento de muchos trastornos neurológicos (McIntosh et al., 1999; Norton et al., 2006). Desde entonces, el interés por estos venenos ha seguido creciendo y se ha convertido en una parte importante de los estudios de Venómica por sus grandes posibilidades como terapias selectivas en humanos. Actualmente, existe ya un fármaco comercializado como sustitutivo de la morfina, Ziconotide (Prialt®), derivado de la estructura de una  $\omega$ -conotoxina obtenida del cono *Pionoconus magus* (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura del fármaco Ziconotide (Prialt®), derivada de una  $\omega$ -conotoxina obtenida de *Pionoconus magus* con 3 puentes S-S resaltados en color amarillo. Izquierda: estructura desarrollada. Derecha: modelo 3D simplificado, coloreado desde el extremo N-terminal (rojo) hasta el extremo C-terminal (azul). Los enlaces disulfuro se muestran en amarillo (Protein Data Base - 1DW5).

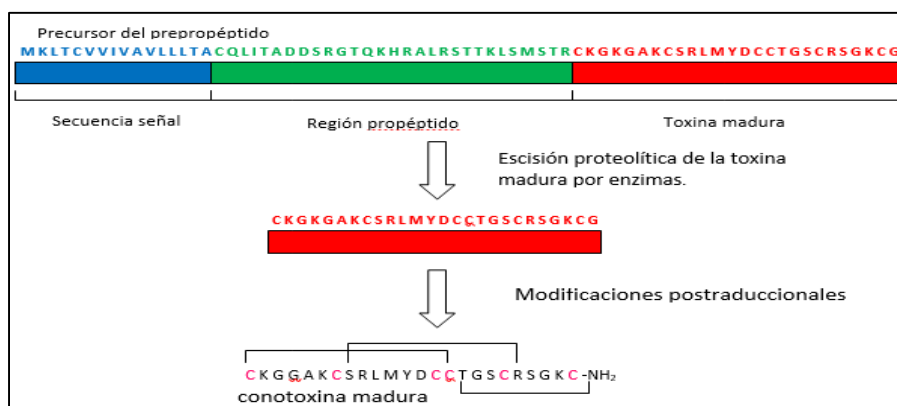
### 3.3.1. Características bioquímicas. El transcriptoma.

Los ARN mensajeros transcritos a partir de los genes que codifican las conotoxinas dan lugar a lo que se conoce como el transcriptoma. En el caso del conducto del veneno, este es el lugar, junto con el tejido del pie –aunque en menor medida-, donde se traducen inicialmente en precursores de los péptidos de cono, dando lugar a lo que se denomina como pre-propéptidos. Estos precursores tienen una estructura primaria característica dividida en 3 dominios (Figura 4), que consisten en:

- Una secuencia de péptido señal hidrófobo conservada (la región “pre-”) en el extremo terminal  $\text{NH}_2$ . La secuencia señal conservada puede desempeñar un papel de direccionamiento hacia una región determinada del retículo endoplásmico donde el pre-propéptido puede sufrir modificaciones postraduccionales y sirve para clasificar las conotoxinas en las denominadas **superfamilias**, esto es, conotoxinas que comparten la misma secuencia señal. Esta secuencia también podría ayudar a la formación específica de los puentes disulfuro que conducen a la toxina madura (Le Gall et al., 1999).
- Una región intermedia “pro”; El papel del propéptido se desconoce en la actualidad, si bien algunos autores consideran también que puede ayudar a la formación de puentes disulfuro.
- Una región correspondiente a la toxina madura, comúnmente rica en cisteínas, en el extremo terminal  $\text{COOH}$ . La región de la toxina madura es hipervariable en su secuencia dentro de una serie de patrones de cisteína que se conservan y dan lugar a distintos esqueletos o “*frameworks*”.

La variabilidad de los residuos entre las cisteínas produce una gran variedad de secuencias de toxinas. (Terlau et al., 2004; Becker et al., 2008; Robinson et al., 2014).

El péptido farmacológicamente activo se genera por escisión enzimática de la secuencia señal y la región "pro" del prepropéptido. Este paso es esencial en la maduración de todos los conopéptidos. (Becker et al., 2008; Buczek et al., 2005; Kaas et al., 2008).



**Figura 4.** Esquema con los pasos de maduración de los conopéptidos para la  $\omega$ -conotoxina MVIIA (Bingham et al., 2010).

Si bien la formación de puentes disulfuro es la modificación postraducciona más común, también son comunes otras como la carboxilación de glutamato a  $\gamma$ -carboxiglutamato, la hidroxilación de prolina a 4-hidroxiprolina o la amidación del extremo C-terminal (Tabla 1) (Buczek et al., 2005; Kaas et al., 2010).

**Tabla 1:** Modificaciones postraduccionales de los conopéptidos (Buczek et al., 2005).

Modificación		Enzimas
<b>Formación de puentes disulfuro</b>		isomerasa
<b>Hidroxilación de</b>	prolina a 4-hidroxiprolina	prolina hidroxilasa
	D-valina a D- $\gamma$ -hidroxivalina	hidroxilasa
	lisina a 5-hidroxilisina	lisil hidroxilasa
<b>Amidación C-terminal</b>		monooxigenasa
<b>Carboxilación de</b>	ácido glutámico a $\gamma$ -carboxiglutamato	glutamato carboxilasa
<b>Bromación de</b>	triptófano a 6-bromo-triptófano	bromo peroxidasa
<b>Epimerización de</b>	triptófano a D-triptófano	epimerasa
	leucina a D-leucina	
	fenilalanina a D-fenilalanina	
<b>Sulfatación de</b>	tirosina a sulfotirosina	tirosil-sulfotransferasa
<b>O-glicosilación</b>		polipéptido HexNac transferasa

Las modificaciones mejoran notablemente la estabilidad de los conopéptidos y refuerzan su afinidad

y su selectividad por sus dianas moleculares (Kaas et al., 2010, Bulaj et al., 2008). Entre todas estas modificaciones, la formación de enlaces disulfuro es particularmente importante porque fija y estabiliza la estructura tridimensional del péptido. Estos enlaces disulfuro se generan mediante la unión entre los numerosos residuos de cisteína presentes en la región de la toxina madura de la estructura primaria (Kaas et al., 2010; Thapa et al., 2014).

En resumen, los conopeptidos se producen a partir de precursores según un proceso de maduración que también implica modificaciones postraduccionales de ciertos aminoácidos (Kaas et al., 2010). La frecuencia y diversidad de estas modificaciones no tiene precedentes en otras familias del reino animal y es una de las principales características de los conopeptidos (Buczek et al., 2005; Norton et al., 2006; Thapa et al., 2014), así como la fuente de su variabilidad y diversidad (Thapa et al., 2014).

Las toxinas maduras generalmente contienen 4 o 6 residuos de cisteína, pero este número puede ser mayor. Su posición dentro de la secuencia también puede variar. Como consecuencia, el número de cisteínas, su disposición en la secuencia primaria y su conexión definen motivos o patrones de cisteína, denominados “*frameworks*”, que permiten la clasificación de conotoxinas (Kaas et al., 2010). Por ejemplo, 4 cisteínas ("C") se pueden organizar de acuerdo con el motivo "C-C-C-C" o "CC-C-C" donde el "-" representa un número variable de aminoácidos (Puillandre et al., 2012). La mayoría de los residuos de cisteína están separados entre sí por 0-6 aminoácidos (Terlau et al., 2004). Hasta hoy, se han descrito alrededor de 25 patrones de cisteína distintas (Robinson et al., 2014; Robinson & Norton, 2014) (Tabla 2).

**Tabla 2:** Patrones de cisteína descritos actualmente para los conopeptidos (Kaas et al., 2010).

Nombre	Patrón de cisteína	No. Cys	Conexión Cys	Nombre	Patrón Cys	No. Cys
<b>I</b>	CC-C-C	4	I-III, II-IV	<b>XV</b>	C-C-CC-C-C-C-C	8
<b>II</b>	CCC-C-C-C	6		<b>XVI</b>	C-C-CC	4
<b>III</b>	CC-C-C-CC	6		<b>XVII</b>	C-C-CC-C-CC-C	8
<b>IV</b>	CC-C-C-C-C	6	I-V, II-III, IV-VI	<b>XVIII</b>	C-C-CC-CC	6
<b>V</b>	CC-CC	4	I-III, II-IV	<b>XIX</b>	C-C-C-CCC-C-C-C-C	10
<b>VI / VII</b>	C-C-CC-C-C	6	I-IV, II-V, III-VI	<b>XX</b>	C-CC-C-CC-C-C-C-C	10
<b>VIII</b>	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	10		<b>XXI</b>	CC-C-C-C-CC-C-C-C	10
<b>IX</b>	C-C-C-C-C-C	6	I-IV, II-V, III-VI	<b>XXII</b>	C-C-C-C-C-C-C-C-C	8
<b>X</b>	CC-C-C	4	I-IV, II-III	<b>XXIII</b>	C-C-C-CC-C	6
<b>XI</b>	C-C-CC-CC-C-C	8	I-IV, II-VI, III-VII, V-VIII	<b>XXIV</b>	C-CC-C	4
<b>XII</b>	C-C-C-C-CC-C-C	8		<b>XXV</b>	C-C-C-C-CC	6
<b>XIII</b>	C-C-C-CC-C-C-C	8		<b>XXVI</b>	C-C-C-C-CC-CC	8
<b>XIV</b>	C-C-C-C	4	I-III, II-IV			

Si bien aún no se han podido determinar todas las conexiones de los puentes disulfuro en los distintos *framework*, sí que se han conseguido distinguir determinadas estructuras, como las estructuras I y X, que tienen las mismas unidades de cisteína CC-CC pero que presentan distintas posibles conexiones diferentes: I-III, II- IV y I-IV, II-III respectivamente (Kaas et al., 2010). En los *framework* a partir del XIV se desconoce la conexión entre las cisteínas, razón por la que no se han incluido en la tabla.

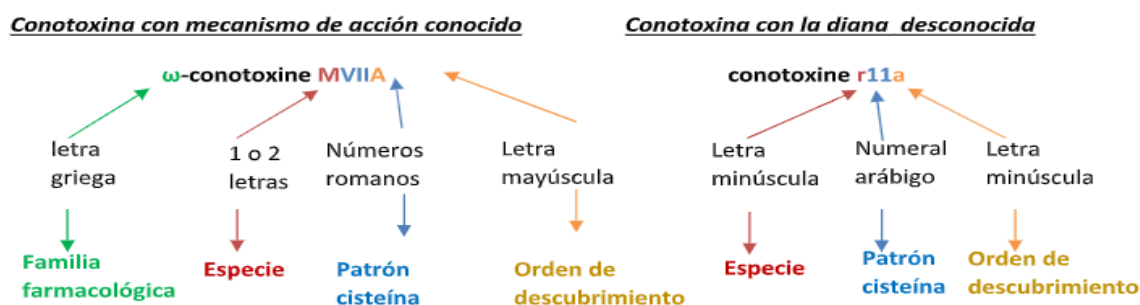
### 3.3.2.Nomenclatura.

El sistema de nomenclatura de las conotoxinas se desarrolló en 1985 para estandarizar el nombre de las conotoxinas y así evitar confusiones (Wang et al., 2004; Olivera et al., 2001) (Figura 5).

1.- Una conotoxina cuyo mecanismo de acción es conocido comienza con una letra griega que indica el tipo de la actividad farmacológica, separada por un guión [-] de la palabra conotoxina. Va seguida de una o dos letras que designan la especie de la que se aisló por primera vez y, a continuación, un número romano que indica el motivo de cisteína del péptido. Finalmente, una letra mayúscula indica el orden de descubrimiento dentro de la categoría. Para abreviar el nombre, el término conotoxina a veces está ausente y el guión va seguido directamente de las letras que designan la especie. Así, la " $\omega$ -conotoxina MVIIA" o " $\omega$ -MVIIA" pertenece a la familia de las  $\omega$ -conotoxinas, se aisló del cono de *Conus magus* (M) y fue el primer péptido descubierto (A) con el motivo de cisteína VII (Gray et al., 1988; Olivera et al., 2001; Wang et al., 2004; Daly et al., 2009).

Para péptidos con la misma actividad farmacológica pero un motivo de cisteína diferente, se agrega una letra mayúscula entre la letra griega y el guión para designar una familia diferente: por ejemplo,  $\alpha$ - y  $\alpha$ A-conotoxinas o  $\kappa$ - y  $\kappa$ A-conotoxinas (Olivera et al., 2001; Wang et al., 2004).

2.- Cuando se descubre una nueva conotoxina y no se conoce la diana, se usa una letra minúscula que representa la especie, seguida de un número arábigo para designar el patrón de cisteína y una letra minúscula para indicar el orden de descubrimiento. Por tanto, la conotoxina "r11a" se aisló por primera vez de la especie *Conus radiatus*. Tras el descubrimiento de que su diana eran los canales de sodio dependientes de voltaje (Olivera et al., 2001; Wang et al., 2004; Daly et al., 2009), pasó a denominarse "iota-conotoxina RXIA" o "i-RXIA".



**Figura 5.** Nomenclatura de conotoxinas (Daly et al., 2009).

### 3.3.3. Clasificación en superfamilias y en familias farmacológica

Las conotoxinas se agrupan en superfamilias en función de la secuencia del péptido señal y del propéptido. Cada superfamilia presenta una gran diversidad estructural y funcional según su patrón de cisteína y su estructura tridimensional. A su vez, estas superfamilias se dividen en familias farmacológicas (Vink et al., 2012) en función de la diana y del tipo de interacción con esta diana –agonista o antagonista, por ejemplo– (Kaas et al., 2010; Puillandre et al., 2012; Daly et al., 2009; Robinson et al., 2014) (Tabla 3).

**Tabla 3:** Clasificación de las conotoxinas según sus familias farmacológicas (Thapa et al., 2014).

Familia	Diana farmacológica
$\alpha$ (ALPHA)	Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)
$\delta$ (DELTA)	Canales de sodio dependientes del voltaje (activación e inactivación)
$\epsilon$ (EPSILON)	Proteínas G asociadas a los receptores presinápticos de los canales de sodio
$\iota$ (IOTA)	Canales de sodio dependientes de voltaje (activación)
$\kappa$ (KAPPA)	Canales de potasio dependientes del voltaje
$\mu$ (MU)	Canales de sodio dependientes del voltaje (bloqueo)
$\rho$ (RHO)	Receptores adrenérgicos $\alpha 1$
$\sigma$ (SIGMA)	Receptores serotoninérgicos 5-HT <sub>3</sub>
$\chi$ (CHI)	Transportadores neuronales noradrenérgicos
$\psi$ (PSI)	Receptores nicotínicos de acetilcolina
$\omega$ (OMEGA)	Canales de calcio dependientes del voltaje

Según estos principios, una superfamilia puede constar de varias familias de conotoxinas con diferentes dianas farmacológicas (Becker et al., 2008; Robinson & Norton, 2014). Por ejemplo, dentro de la superfamilia O, todos los péptidos tienen el motivo de cisteína CC-CC-CC y se traducen con una misma secuencia señal conservada, pero se han identificado al menos 4 familias farmacológicas:  $\delta$ -conotoxinas,  $\mu$ -conotoxinas,  $\kappa$ -conotoxinas y  $\omega$ -conotoxinas que, respectivamente, inhiben la inactivación canales de sodio, las corrientes de sodio, interactúan con los canales de potasio o los bloquean, todos ellos dependientes de voltaje (Becker et al., 2008, Olivera et al., 2007).

### 3.3.4. Perspectivas y aplicaciones terapéuticas de las conotoxinas.

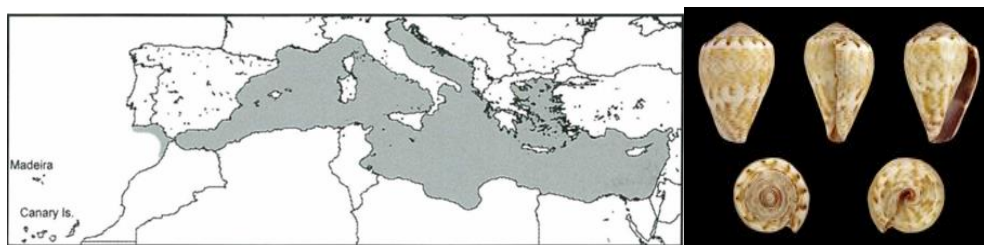
En los últimos años, los conopéptidos se han identificado como posibles candidatos terapéuticos (Vink et al., 2012). De hecho, son valiosas herramientas farmacológicas para comprender las funciones fisiológicas de los diferentes canales iónicos y receptores (Vetter et al., 2012). Además, su pequeño tamaño, su estructura estable y su gran potencia y especificidad hacen que estas toxinas sean candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos tratamientos (Halai et al., 2009; Vetter et al., 2012; Layer et al., 2006). Como ejemplo, el medicamento farmacéutico aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), Ziconotide (Prialt®; Elan Pharmaceuticals, Inc.; Fig. 2).

Ziconotide es el equivalente sintético de la  $\omega$ -conotoxina MVIIA, extraída originalmente de *Pionoconus magus* (Linnaeus, 1758), y que se utiliza como sustitutivo de la morfina pero con una potencia 10 veces superior a ésta y sin los efectos de habituación o adicción.

El espectro potencial de actividades de los péptidos de los conos abarca actualmente actividades analgésica, antiepiléptica, cardioprotectora y neuroprotectora (Bingham et al., 2010). Es por esto que se están desarrollando varios conopéptidos para el tratamiento de diversas patologías como el dolor neuropático, la epilepsia, el infarto de miocardio, la hipertensión, el ictus y enfermedades neurológicas como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer (McIntosh et al., 2001; Bingham et al., 2010; Robinson et al., 2014). Los conopéptidos también son herramientas utilizadas en la investigación del cáncer, enfermedades neuromusculares y psiquiátricas (Bingham et al., 2010). Sin embargo, por el momento, la mayor parte de la investigación se centra en el desarrollo de analgésicos (Vink et al., 2012).

#### 3.4. *Lautoconus ventricosus* (Gmelin, 1791).

El presente trabajo se centra en el estudio de las conotoxinas del veneno de la especie *Lautoconus ventricosus* (Gmelin, 1791) y va a usar como punto de partida el análisis preliminar del transcriptoma de su conducto venenoso. *L. ventricosus* es un pequeño cono vermívoro, den entre 15 y 65 m de largo, cuya área de distribución se centra en el Atlántico Occidental (Bahía de Cádiz y Norte de África) y el Mediterráneo (Figura 6). El color puede variar desde el oliváceo a un marrón amarillento, con un patrón de dibujo en la concha reticulado y con motas. La parte superior (espira) es alta y algo rugosa, con máculas (Figura 6). Habita fundamentalmente en fondos rocosos mezclados con fondos arenosos o praderas, normalmente en la parte superior del infralitoral o en la zona intermareal.



**Figura 6.** Izquierda: Distribución geográfica de *Lautoconus ventricosus*; derecha: conchas de de *Lautoconus ventricosus* (Imagen de H. Zell 2014).

Durante el presente año se han publicado por primera vez el genoma completo dos especies de conos: *L. ventricosus* (Pardos-Blas et al., 2021) y *Dendroconus betulinus* (Peng et al., 2021). El estudio del genoma y del transcriptoma de varios individuos de *L. ventricosus* indica la presencia de 227 secuencias de conopéptidos, que pueden clasificarse en 28 superfamilias de proteínas conocidas y en 46 nuevas. De ellas,

las superfamilias más abundantes son O1, W, T, New17, O2 y H, representando el 43% de toda la diversidad detectada.

## **5. OBJETIVOS.**

Basado en los análisis preliminares publicados del transcriptoma del conducto venenoso de *Lautoconus ventricosus* este proyecto tiene como objetivos principales realizar un estudio proteómico del veneno de *L. ventricosus* y determinar la viabilidad del mantenimiento en acuario de ejemplares salvajes para poder, en el futuro, estudiar diversos aspectos que puedan influir en la producción de las conotoxinas. Este estudio se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

- 1- Identificación de perfiles característicos de los componentes del conducto del veneno extraídos mediante HPLC/MS.
- 2- Identificación de las conotoxinas mediante análisis comparativo de las masas monoisotópicas con las conotoxinas identificadas en el transcriptoma mediante herramientas bioinformáticas.
- 3- Estudios de la variación de los perfiles proteómicos en función del método de conservación del conducto del veneno y en función del método de extracción del conducto del veneno.
- 4- Estudio de viabilidad del mantenimiento en acuario de ejemplares de *L. ventricosus*.

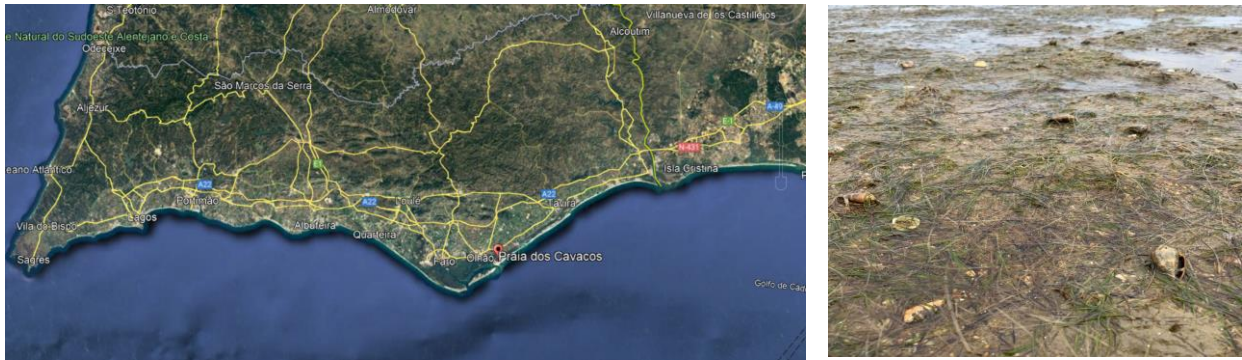
Con respecto a la propuesta inicial, se ha decidido no abordar los puntos 5 y 6: “modelización molecular”, ya que ha sido objeto de otro trabajo (TFG) realizado paralelamente; y “síntesis *in vitro*, elucidación estructural (RMN) y ensayos de bioactividad”, ya que excedían el tiempo disponible para la realización de este TFM, quedando como objetivo para futuros desarrollos.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. Recolección de muestras

Los ejemplares de *L. ventricosus* utilizados en este estudio fueron recolectados en zona intermareal de la bahía de Praia dos Cavacos (Algarve, Portugal) (37° 2' 12" N, 7° 47' 41" W) (Figura 7) en Febrero de 2020. En la campaña de muestreo participaron investigadores de la Universidad de Algarve (Portugal) e investigadores de la Universidad de Cádiz (UCA). En dicho muestreo se obtuvieron un total de 180 ejemplares de distinto tamaño, entre 20 y 35 mm de longitud.



**Figura 7.** Zona de muestreo. Praia dos Cavacos (Algarve – Portugal).

### 6.2. Mantenimiento de las muestras.

Los ejemplares de *L. ventricosus* se introdujeron en menos de 12 horas desde su captura en un acuario preparado previamente al efecto y se mantuvieron durante 15 meses en el laboratorio húmedo del Departamento de Biología (CASEM, Campus de Puerto Real) y, posteriormente (Mayo, 2021), en las instalaciones de los Servicios Centrales de la Planta de Cultivos Marinos (CASEM) (Figura 8).

Las condiciones de mantenimiento de los ejemplares en el acuario en ambas localizaciones fueron las siguientes:

- a) Dimensiones. El acuario tiene unas dimensiones de 50 cm x 30 cm x 30 cm, con una capacidad de 40 L.
- b) Renovación de agua. El acuario consta de un rebosadero provisto de una malla para evitar la salida de los conos. El agua es salina, procedente de un pozo que se surte directamente de agua procedente del Río San Pedro (Campus de Puerto Real, Puerto Real, Cádiz) y que surte tanto a la planta de cultivos marinos como a las instalaciones del laboratorio húmedo del Departamento de Biología. El número de renovaciones totales del agua del acuario en un periodo de 24 h es de 3 en el caso del laboratorio húmedo y de 2 en el caso de la planta de cultivos marinos, ya que se comprobó que era suficiente para mantener los niveles de oxigenación y limpieza del acuario.

- c) **Sustrato.** El sustrato de la zona de muestreo (Praia dos Cavacos) es una arena fina casi de tipo limo, muy similar a la existente en la playa del Río San Pedro. Por tanto, el acuario se equipó con una capa de unos 3-5 cm de profundidad con algunas piedras y conchas marinas (al ser zonas preferidas de puesta de huevos) de arena procedente de la playa del Río San Pedro.
- d) **Oxigenación, temperatura, salinidad, fotoperiodo.** El acuario se mantuvo en condiciones de fotoperiodo natural, ajustándose a la variación natural anual con el fin de simular las condiciones de su medio natural y fomentar la aclimatación y la puesta de huevos. La temperatura se corresponde con la del agua suministrada, en un rango entre los 18 y los 20,9 °C a lo largo del año. La oxigenación se ha realizado mediante dos peras de oxigenación de piedra pómez, que han mantenido la concentración de oxígeno disuelto entre 6,9 – 7,3 mg/L, mientras que la salinidad se ha mantenido constante en torno a los  $36,7 \pm 0,3$  g/L y el pH en torno a  $7,6 \pm 0,14$ . Los valores de temperatura, salinidad, oxígeno y pH se controlan semanalmente.
- e) **Alimentación.** Cada 15 días se les suministran 80 g de gusanos vivos (*Nereis diversicolor*) obtenidos en Decathlon S.A. de El Puerto de Santamaría.
- f) **Limpieza.** Se realiza un control semanal de limpieza para eliminar acumulaciones de algas en las paredes y ejemplares muertos. El sustrato se renovó con el cambio de localización de los ejemplares, del acuario del laboratorio húmedo al de la planta de cultivos marinos, en Mayo de 2021.



**Figura 8.** Vista general del acuario de *L. ventricosus* en la planta de cultivos marinos (izquierda) y ejemplares vivos mantenidos en el acuario (derecha).

### 6.3. El transcriptoma de *Lautoconus ventricosus*

La transcriptoma de *L. ventricosus* fue realizado por personal del grupo del Dr. Rafael Zardoya (Museo Nacional de Ciencias Naturales, MNCN-CSIC) en Madrid y forma parte del estudio del genoma de

*L. ventricosus* recientemente publicado (Pardos-Blas et al., 2021). Brevemente, y a modo ilustrativo, el protocolo de extracción de RNA consistió en la incubación de cada muestra de tejido de pie y de glándula de veneno en 300  $\mu$ L de reactivo TRIzol LS Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y su molido con perlas de cerámica en un homogeneizador de tejidos Precellys Evolution. La solución se mezcló con 60  $\mu$ L de cloroformo. Después de la centrifugación (12.000 g durante 15 minutos a 4° C), se recuperó la fase acuosa y el ARN se precipitó en 250  $\mu$ L de isopropanol y se incubó durante toda la noche a -80 °C. El kit de minipreparación de ARN Direct-zol (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.) se utilizó para purificar el ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniéndose entre 5 y 15  $\mu$ g.

La construcción de la biblioteca y la secuenciación del transcriptoma de la glándula del veneno (muestra CV8) la llevó a cabo la empresa AllGenetics (Oleiros, España) en 2012 mientras que los transcriptomas del pie (muestras CV10 – CV18) se obtuvieron en Sistemas Genómicos (Valencia, España) en 2016. Las conchas voucher de los ejemplares secuenciados CV8, CV10-CV18 se conservan depositados en el Museo Nacional de Ciencias Naturales MNCN-CSIC de Madrid.

#### 6.4. Extracción del veneno

Para la extracción del veneno se utilizaron ejemplares vivos de los mantenidos en el acuario. Los ejemplares se diseccionaron inmediatamente para extraer el conducto del veneno. Para ello, se extrajo de la concha el animal completo y se practicó una incisión en la parte ventral con una cuchilla. Se separó cuidadosamente el pie hasta llegar al conducto. El conducto se extrajo mediante unas pinzas y se colocó sobre un portaobjetos de vidrio. A continuación, se separó la pera o bulbo del veneno, que no contiene conotoxinas, del conducto del veneno (Figura 9).



**Figura 9.** Conducto del veneno de *L. ventricosus*.

El conducto del veneno, de entre 40-50 mm de longitud, se colocó en un tubo de eppendorf y se introdujo en un recipiente con nitrógeno líquido para, a continuación, someterlo a un proceso de liofilización en un sistema de vacío dentro de un tubo Schlenk. De esta forma el conducto queda listo para la posterior extracción de los péptidos, preservando su integridad.

Las conotoxinas se extrajeron mediante adición de 1,5 mL de una disolución acuosa con un 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) o de ácido fórmico (FA). El contenido del tubo eppendorf (conducto y medio de extracción) se homogeneizó utilizando un homogeneizador rotativo BIO-GEN PRO 200 durante 3 minutos. La disolución resultante se centrifugó a 16100 g durante 15 min. El sobrenadante se separó mediante una micropipeta. La operación se repitió 3 veces. La combinación de los sobrenadantes de las extracciones repetidas constituye el extracto crudo del veneno, y contiene las conotoxinas, péptidos y compuestos hidrofílicos presentes en el mismo. El extracto se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior estudio mediante RP-UPLC/MS, o alternativamente fue liofilizado y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en forma de extracto seco.

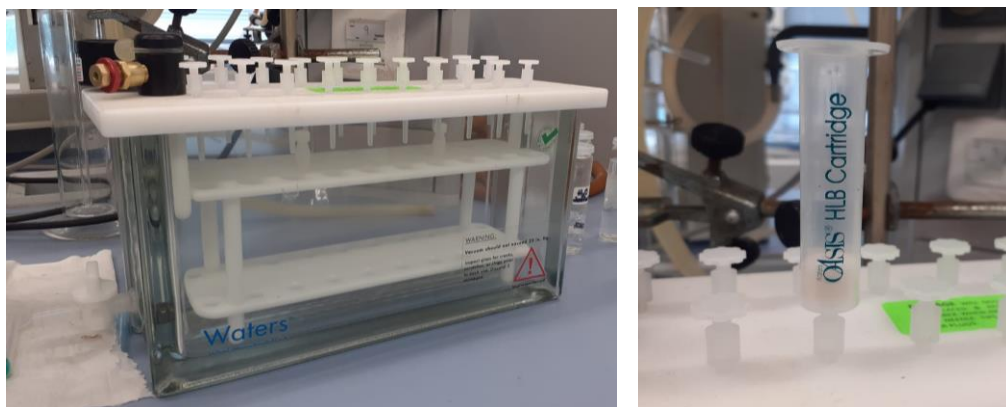
#### **6.5. Evaluación de los distintos métodos de conservación de las muestras.**

Dada la existencia y disponibilidad para el grupo de investigación de “Venómica Evolutiva y Síntesis de Compuestos Bioactivos” de un gran banco de conductos de veneno de un gran número de especies preservados de distintas formas, inicialmente para estudios de transcriptómica, uno de los objetivos de este trabajo es explorar la viabilidad de su uso para estudios de proteómica y la posible variación de los perfiles proteómicos en función del método de conservación utilizado. Con este fin, se colectaron 3 individuos de *L. ventricosus* del acuario (muestras PT003, PT004 y PT005) y se extrajo el conducto del veneno según el protocolo detallado en la sección 3.4. A continuación, se introdujeron los conductos en tubos de eppendorf conteniendo uno 1 mL de una disolución de acetonitrilo 20% + 0,1% ácido fórmico, otro en 1 mL de etanol absoluto, y otro en 1 mL de RNA-Later (Invitrogen Thermo Fisher). Las muestras se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de 15 días.

Transcurrido el tiempo anterior, se procedió a la extracción del veneno de los conductos preservados. Para ello, se sacaron del líquido de conservación, se liofilizaron y se sometieron a extracción en las mismas condiciones antes descritas (sección 6.4). Con el fin de descartar la presencia de sales que pudieran afectar al espectrómetro de masas, las muestras se sometieron a un proceso de purificación mediante extracción en fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction), para lo que se utilizaron cartuchos Oasis HLB Waters<sup>TM</sup> de 6 cc de capacidad. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

Los cartuchos se conectaron a una plataforma de extracción Waters con capacidad para 20 cartuchos. Dicho sistema está provisto de un regulador de vacío con el fin de controlar el goteo a través de los cartuchos SPE, que este no debe exceder de 1 gota/seg aproximadamente. Los cartuchos se cargaron con las disoluciones que se describen a continuación para acondicionar la columna, cargar la muestra, lavarla y realizar la posterior elución, siguiendo las instrucciones del fabricante. El vacío se va ajustando en función del goteo en cada etapa del proceso (Figura 10).

- 1.- *Etapla de acondicionamiento y equilibrado*: Se realizó añadiendo, por este orden, 3 mL de acetonitrilo puro y 3 mL de una disolución acuosa con un 0,7% de ácido trifluoroacético (TFA).
- 2.- *Carga*: La muestra, disuelta en un volumen de entre 3 - 4,5 mL se pasa por la columna, permitiendo que los péptidos y demás compuestos hidrofílicos se fijen en la fase sólida.
- 3.- *Lavado 1*: 6 mL de una disolución acuosa con un 0,7% ácido trifluoroacético (TFA).
- 4.- *Lavado 2*: 6 mL de agua destilada.
- 5.- *Elución*: 8 mL de una disolución MeCN/H<sub>2</sub>O al 70% en acetonitrilo.



**Figura 10.** Izquierda: plataforma de extracción en fase sólida de las muestras de conotoxinas.  
Derecha: Cartucho SPS Oasis HLB Waters™.

## 6.6. Análisis RP-UPLC/MS

La RP-UPLC/MS se llevó a cabo en los Servicios Centrales de Investigación Científica y Tecnológica (SC-ICYT – UCA) en un sistema de cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento (UPLC) ACQUITY H-Class, con un sistema de disolvente binario y un gestor de muestras automático equipado con una columna de fase reversa ACQUITY UPLCr BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7  $\mu$ m), funcionando a una temperatura de 50°C. Las fases móviles consistieron en el eluyente A (ácido fórmico al 0,1% en agua, v / v) y eluyente B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo, v / v). Estas fases se administraron a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min mediante el uso de un programa de gradiente lineal de la siguiente manera: 0-14 min, 95-5% A; 14-16 min, 5-95% A; 16-18 min, 95-5% A. El volumen de inyección fue de 2  $\mu$ L.

El UHPLC estaba acoplado a un espectrómetro de masas en tándem de tiempo de vuelo cuadrupolo XEVO-G2-S QTOF equipado con una fuente de ionización por electro-spray (ESI). Los parámetros operativos en ESI se establecieron de la siguiente manera en modo positivo: voltaje del cono de muestra de 20 V; temperatura de la fuente de 120 °C; flujo de gas del cono de 10 L/h; Flujo de gas de desolvatación de 850 L/h. Las adquisiciones se llevaron a cabo en el intervalo carga/masa ( $m/z$ ) de 100 Da a 3000 D. Se

utilizó leucina-encefalina ( $m/z$  556.2771 en modo de ión positivo) como referencia externa de LockSpray, infundido a un flujo constante de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La adquisición y visualización de datos se realizó mediante el software MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, Reino Unido) en modo de ión positivo.

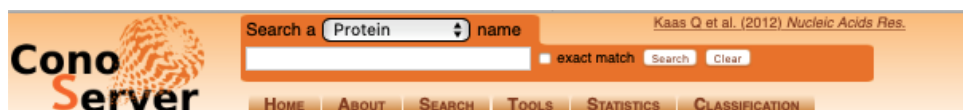
En las primeras fases del estudio, en el que se estaba realizando la optimización del método de extracción y purificación del veneno, se realizaron análisis de las muestras directamente extraídas, así como de las disoluciones de carga, lavado y elución, en el caso de las muestras desaladas a través de SPE, con el fin de determinar si el proceso de acondicionado de la columna se había realizado correctamente y determinar en qué fracción se encontraban las conotoxinas. El estudio de los cromatogramas y la determinación de las masas monoisotópicas se realizó utilizando el programa MassLynx<sup>TM</sup>, incorporado en el propio equipo de líquidos-masas.

#### **6.7. Herramientas bioinformáticas para el análisis e identificación de péptidos.**

Además del programa MassLynx<sup>TM</sup> para el análisis de los datos de UPLC-MS, se ha utilizado la herramienta bioinformática Conoserver ([www.conoserver.org](http://www.conoserver.org)) para la identificación de péptidos en base a las masas monoisotópicas obtenidas de los análisis de UPLC-MS.

Conoserver (Figura 11) es una base de datos creada en 2007 (Kaas et al., 2008; Kaas et al., 2012;) especializada en la secuencia y la estructura de los conopéptidos. Los datos se recopilan de publicaciones revisadas y de fuentes de datos públicas, como son UniProtKB/Swiss-Prot, NCBI nucleotide y The World Wide Protein Data Bank. La información se selecciona manualmente e incluye el análisis de las regiones de la secuencia (péptido señal, pro-péptido y péptido maduro). El portal contiene una serie de herramientas bioinformáticas que permiten la identificación de conopéptidos basada en las masas monoisotópicas, así como la identificación de los frameworks de las cisteínas, las superfamilias a las que pertenecen, y los péptidos maduros en las secuencias precursoras. Esta base de datos se actualiza varias veces al año.





## ConoServer, a database for conopeptides

ConoServer is a database specializing in the sequence and structures of conopeptides, which are peptides expressed by carnivorous marine cone snails. A fascinating feature of these peptides is their high specificity and affinity towards human ion channels, receptors and transporters of the nervous system. This makes conopeptides an interesting resource for the physiological studies of neuroreceptors and promising drug leads. Conopeptides are further described [here](#) and a selection of recent reviews on the subject can be found [here](#).



**Classifications.** Conopeptides are classified into disulfide rich (conotoxins) and several classes of disulfide poor peptides. The three classification schemes used in ConoServer, the gene superfamilies, the cysteine frameworks, and the pharmacological families are described and analyzed [here](#).



**Post-translational modifications.** Conopeptides are heavily post-translationally modified and the list of modifications found naturally or introduced artificially is provided [here](#).

**Statistics.** Statistics on the currently known conopeptides are provided [here](#). The statistics include: the relationship between conopeptide classification schemes, the sequence consensus between signal peptides of each gene superfamily, the number of entries for each cone snail species, the characteristics of conopeptides for which a three-dimensional structure was determined, the number of patented sequences, and the journals the most cited in the ConoServer.

	NUMBER OF ENTRIES	SPECIES COVERAGE	LINKS TO UniProt, GENBANK OR PDB
NUCLEOTIDES	2986	90	1814
PROTEINS	8252	122	4807
STRUCTURES	222	46	222

**Figura 11.** Vista general del portal Conoserver.

El portal contiene las siguientes herramientas:

1.- **Conoprec.** Permite analizar una secuencia o una serie de secuencias mediante la introducción de un archivo tipo “.fasta” –archivo de texto plano con las secuencias completas a analizar- para determinar las secuencias del péptido señal, propéptido y péptido maduro.

**Figura 12.** Herramienta Conoprec de Conoserver.

2.- **ConoMass**: Differential PTM mass computation (Step 1). Permite subir el archivo con las secuencias de los péptidos que se van a comparar con las masas monoisotópicas obtenidas de los análisis de UPLC-MS y seleccionar las modificaciones postraduccionales que se aplicarán (paso 1) (Figura 13).

**Figura 13.** Vista de la herramienta ConoMass (Step 1).

El fichero producido, se introduce en la herramienta ConoMass (Step 2) (Figura 14) junto con un archivo que contenga las masas monoisotópicas identificadas en el experimento de UPLC-MS (formatos válidos .csv, .rtf ó .txt). El programa permite buscar masas monoisotópicas o masas medias, así como el grado de precisión o coincidencia entre la masa experimental y la calculada por el portal (normalmente situada en 0,1).

**Figura 14.** Vista del portal ConoMas (Step 2).



3.- **Compare mass list:** permite la comparación de listas de masas para la identificación de masas similares.

4.- **Remove duplicate masses:** permite la eliminación de masas duplicadas con una precisión determinada (normalmente fijada en 0,05). Esta herramienta es particularmente útil para generar el archivo de masas monoisotópicas a partir del análisis de las masas monoisotópicas obtenidas del análisis de UPLC/MS.

5.- **Download conoserver's data:** permite descargar los ficheros fasta con secuencias de proteínas, ácidos nucleicos o estructuras 3D contenidas en el portal conoserver. Con este fichero es con el que se ha enriquecido la base de datos que se ha utilizado para la identificación de las conotoxinas de *L. ventricosus*.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1.- Mantenimiento en cautividad de *L. ventricosus*.

Los individuos de la primera campaña de captura que se trajeron al laboratorio húmedo del Departamento de Biología durante 15 meses y se trasladaron desde mayo 2021 a las instalaciones de los Servicios Centrales de la Planta de Cultivos Marinos (CASEM).

- Los ejemplares se adaptaron bien a las condiciones de alimentación que se les suministraron cada 15 días en cantidades de 80 g de gusanos vivos (*Nereis diversicolor*), durante los 15 meses y por medidas sanitarias del COVID 19 había un confinamiento entre marzo y junio de 2020 donde tuvimos que alimentar a los individuos con gusanos congelados, aun así los ejemplares de *L. ventricosus* lo aceptaron bien sin que hubiera mortalidad apreciable en comparación con la alimentación con gusanos vivos.

- Durante el mantenimiento de los ejemplares en el laboratorio húmedo del Departamento de Biología se realizó un seguimiento en vez en cuando de las condiciones de salinidad, oxigenación, pH. Una vez se pasaron los ejemplares al acuario nuevo en las instalaciones de los Servicios Centrales de la Planta de Cultivos Marinos (CASEM) se realizaba el seguimiento una vez a la semana y se tomaron los datos (Tabla 4).

Tabla 4: Datos de seguimiento físico-químico del acuario.

Fecha	Oxígeno (mg/L)	Salinidad (g/L)	Tº ( °C)	pH
10/05/2021	7,2	36,9	18,6	7,51
19/05/2021	7	36,6	20,9	7,6
26/05/2021	6,9	36,7	19,8	7,55
02/06/2021	7,1	36,9	20,1	7,84
09/06/2021	6,3	36,6	21	7,49
15/06/2021	6,3	36,6	21,1	7,59
23/06/2021	5,4	36,6	20,3	7,5
30/06/2021	6,9	36,5	21,2	7,7
09/07/2021	6,7	36,2	22,8	7,81
14/07/2021	6,7	36,5	22	7,79
21/07/2021	6,7	36,5	22,5	7,73
28/07/2021	6,1	36,5	21,7	7,64
04/08/2021	6,4	36,4	21,1	7,95
11/08/2021	6,7	36,2	23,1	7,89

- Como parte del seguimiento de los acuarios se realizaba una limpieza semanal de los acuarios para eliminar cualquier tipo de contaminación y evitar la posible muerte de los ejemplares. En paralelo, se

realizaron recuentos de los individuos que sobrevivieron y se quitaron los que están muertos. Durante todo el periodo del mantenimiento de los ejemplares en ambas instalaciones, los individuos de *L. ventricosus* que se trajeron durante la primera campaña de captura se adaptaron hasta el punto de haber pasado por varias fases de puesta de huevos en Marzo-Mayo de 2020 y 2021, y en Septiembre-Octubre de 2020. De hecho aún quedaban unos 70 ejemplares vivos de entre los 180 iniciales. En junio de 2021 y como resultado de la segunda campaña de captura se trajeron 190 ejemplares nuevos que se añadieron a los antiguos y que, tras un periodo en el que parecía que se habían adaptado, tuvo lugar una mortalidad masiva en muy poco tiempo, en la que solo sobrevivieron 4 ejemplares del total. Recientemente se ha repoblado el acuario con nuevos ejemplares que parecen haberse adaptado muy bien.

## 7.2.- Muestras para el estudio proteómico del conducto del veneno de *L. ventricosus*.

Las muestras analizadas se corresponden a las obtenidas en la campaña 2020 en Algarve, Portugal (Sección 6.1) y mantenidas bajo condiciones controladas en acuario (Sección 6.2). Las muestras analizadas se corresponden con los siguientes códigos y condiciones, de acuerdo con los protocolos explicados en la sección anterior:

Tabla 5: Organización de las muestras y sus códigos.

Código muestra	No. individuos	Método de conservación	SPE	UPLC-MS
PT002	10	Liofilización y extracción	Si	Si
PT003	1	MeCN	Si	Si
PT004	1	EtOH	Si	Si
PT005	1	RNA-Later	Si	Si
PT006	5	Liofilización y extracción	Si	Si
PT007	1	Liofilización y extracción	Si	Si
PT008	1	Liofilización y extracción	Si	Si
PT009	1	Liofilización y extracción	Si	Si
PT010	1	Liofilización y extracción	No	Si
PT011	3	Liofilización y extracción	No	Si
PT012	1	Liofilización y extracción	No	Si
PT013	1	Liofilización y extracción	No	Si
PT014	1	Liofilización y extracción	No	Si
PT015	1	Liofilización y extracción	No	Si
PT016	1	Liofilización y extracción	No	Si

**SPE:** Solid Phase Extraction, realizado con columnas OASIS HLB (ver Sección 6.5).

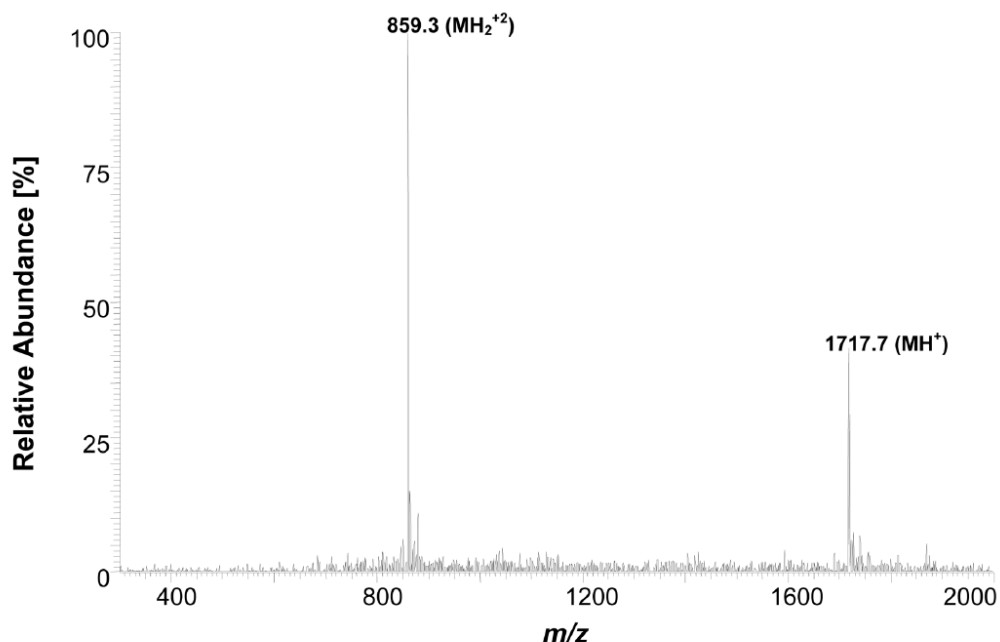
**Vouchers** correspondiente con el código de la muestra y depositado en el Departamento de Ciencia de los Materiales, Ciencia de los Materiales y Química Inorgánica.

**Muestras PT012-PT016**, una vez separada una alícuota para el análisis por UPLC-MS, se combinaron y se enviaron para análisis posterior por MS/MS.

A continuación se presentan los resultados del análisis mediante UPLC/MS y la identificación de las proteínas asociadas a dichas masas.

### 7.3. Análisis de la viabilidad de los distintos métodos de conservación del conducto del veneno para el análisis proteómico de conotoxinas.

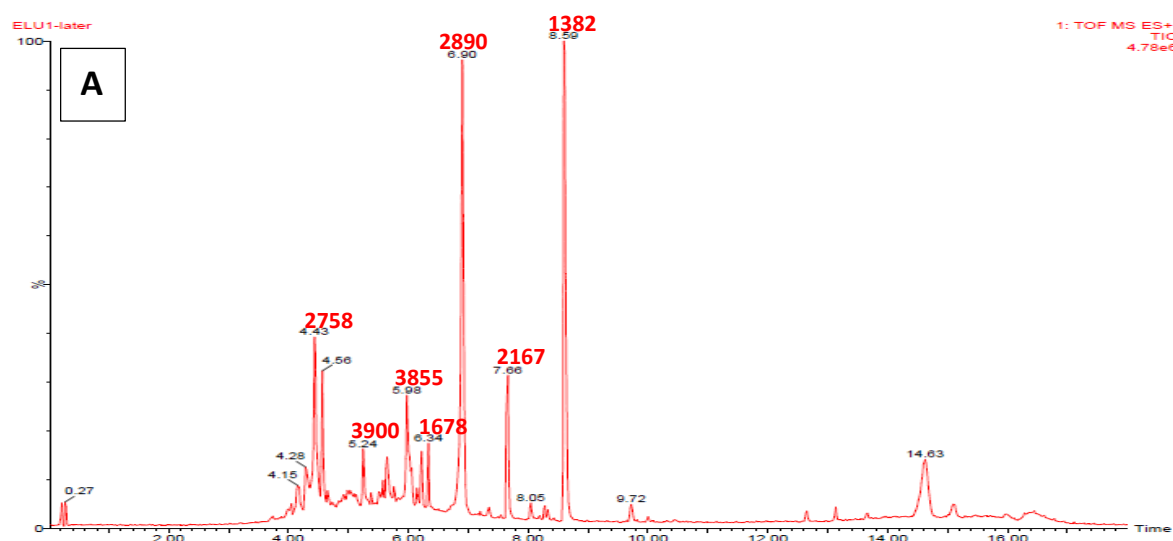
En el anexo II se detalla la lista de todas las masas moleculares de tipo peptídico que se obtuvieron del análisis de UPLC-MS. Estas masas pueden corresponder a las masas monoisotópicas de los iones clúster (figura 14)  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$ ,  $[M+3H]^{3+}$ ,  $[M+4H]^{4+}$ ,  $[M+5H]^{5+}$  y  $[M+6H]^{6+}$  (no se han detectado iones heptacargados), así como las posibles combinaciones con otros iones. Los casos más habituales detectados han sido distintas combinaciones con  $Na^+$ ,  $K^+$ , y  $[NH_4]^+$ . Por ejemplo,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+H+K]^{2+}$ ,  $[M+H+Na]^{2+}$ ,  $[M+2H+K]^{3+}$ ,  $[M+H+2K]^{3+}$ , etc, entre algunos de los más habituales. A partir de las masas de estos clústeres, se determinaron las masas monoisotópicas correspondientes a los péptidos correspondientes en cada caso.

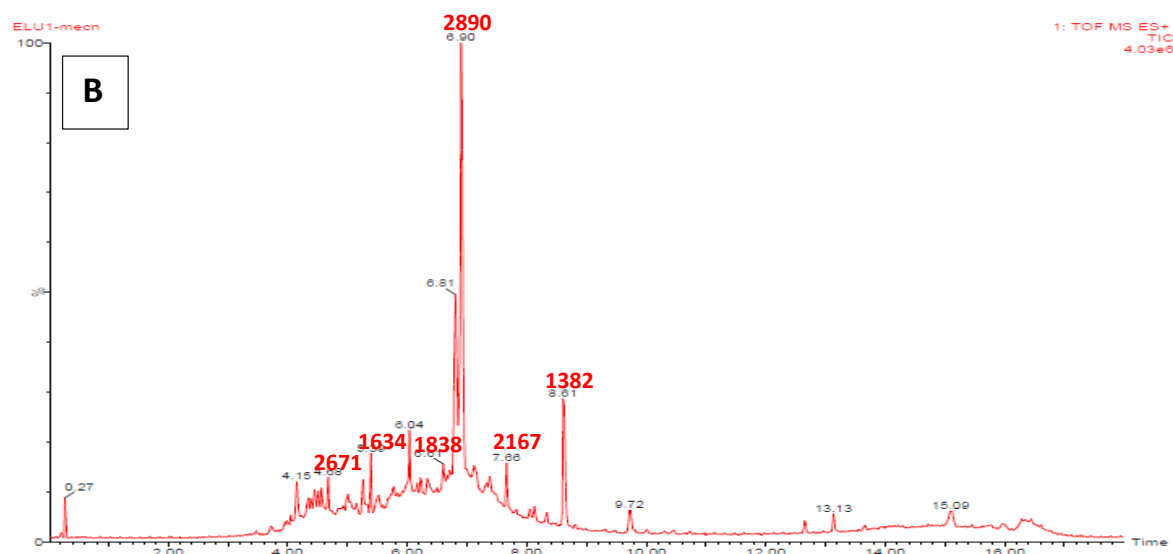


**Figura 14:** Espectro de masas correspondiente a un péptido de masa 1716.7 Da mostrando el ión monopositivo  $[MH]^+$  a  $m/z$  1717.7, y el clúster  $[MH_2]^{2+}$  a 859.3.

Para evaluar la eficiencia de los distintos métodos de conservación de muestras, Se colectaron individuos de *L. ventricosus* y se conservaron los respectivos conductos del veneno en MeCN 20% + 0.1% FA (PT003), en etanol (PT004), en RNA-Later (PT005), y se añadió un conducto no preservado (PT007; conducto liofilizado y directamente extraído, sin haber pasado por ningún tipo de disolvente de conservación) al experimento para comparar los resultados. Luego se analizaron el contenido y el perfil de conotoxinas por UPLC-MS en los SCICYT – UCA. Las muestras en RNA-Later, MeCN 20% + 0.1% FA, etanol y el conducto no preservado se pasaron primero por el sistema de SPE como se ha indicado en la sección 6.5 en Materiales y Métodos. Al ser la primera vez que se realizaba este proceso, se analizaron por UPLC-MS por separado las fracciones de carga, lavado, elución, a fin de determinar dónde se encontraban los péptidos y si el proceso de acondicionamiento se había realizado correctamente. En todos los casos, los péptidos se localizaron en la fracción de carga y en la elución. No se encontraron péptidos en las fracciones de lavado.

La figura 15 muestra los cromatogramas de la elución de las muestras preservadas en RNA-Later y en MeCN 20% + 0.1% FA, que son las que salieron con mejor resolución e intensidad de los picos correspondientes a conotoxinas. El resto de cromatogramas se adjuntan en el anexo.





**Figura 15:** Cromatogramas UPLC-MS de: A: muestra preservada en RNA-Later. B: muestra conservada en MeCN 20% + 0.1% FA.

El análisis de los espectros de UPLC-MS de las muestras reveló el número de masas monoisotópicas únicas determinadas una vez eliminadas las masas duplicadas en cada caso. En la siguiente tabla se ven los datos de cada muestra:

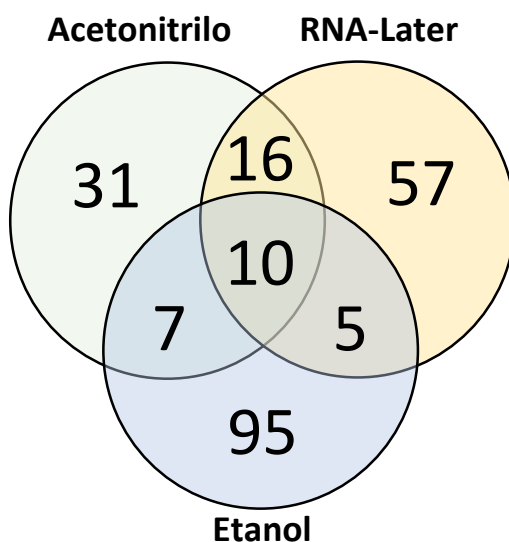
Tabla 6: Masas monoisotópicas determinadas en las muestras de conducto de veneno según el método de preservación.

	Carga+Elución	Lavado
RNA-Later	88	0
MeCN 20% + 0.1% FA	64	0
Etanol	117	0
Conducto no preservado*	120	0

\*Conducto no preservado hace referencia al análisis del conducto liofilizado y directamente extraído, sin haber pasado por ningún tipo de disolvente de conservación

El análisis de los cromatogramas UPLC-MS de las 3 muestras de conducto venenoso conservadas en un medio y la muestra de conducto fresco (no preservado) reveló que las masas monoisotópicas observadas se encontraron en el intervalo entre 300 y 10000 Da, con la gran mayoría de ellas entre 500 y 5000 Da en todos los casos. En la muestra conservada en RNA-Later se detectaron en total 88 masas moleculares únicas, mientras no se detectó ninguna masa peptídica en el lavado. Los picos más intensos se encuentran en un tiempo de retención de 6,90 min y 5,59 min que corresponden respectivamente a las masas moleculares 2890 Da y 1382 Da (figura 14-A). En la muestra preservada en MeCN 20% + 0.1% FA se

detectaron 64 masas monoisotópicas combinando la carga con la elución, no detectándose ninguna masa de carácter peptídico en el lavado. El pico más intenso aparece a RT = 6,90 min y vuelve a corresponder al peso molecular 2890 Da (Figura 14-B). Para la muestra preservada en etanol se detectaron 117 masas moleculares únicas en la carga + elución, y nuevamente no se detectó ninguna masa peptídica en el lavado. En el caso de la muestra del conducto no preservado (PT007), se detectaron un total de 120 masas monoisotópicas únicas. El pico más intenso se encuentra en el tiempo de retención 7.10 min y vuelve a corresponder al peso molecular 2890 Da.



**Figura 16:** Superposición de masas encontradas en muestras de conductos de veneno conservadas en RNA-Later, MeCN 20% + 0.1% FA, y en etanol.

Comparando el total de masas moleculares de las 3 muestras en distintos medios de preservación, se encontraron 10 masas monoisotópicas en común. Curiosamente, y en contra de lo generalmente aceptado, en la muestra conservada en etanol se detectó casi el mismo número de masas que en el conducto fresco no preservado. Se detectaron más masas moleculares que en las muestras conservadas en RNA-Later y MeCN 20% + 0.1% FA (Figura 16). Las muestras preservadas en RNA-Later y MeCN 20% + 0.1% FA comparten entre sí un número significativo de masas en común (16), en comparación con el menor número observado entre estas y la muestra preservada en etanol (5 y 7 respectivamente). La intensidad de los picos observada en el cromatograma de la muestra en etanol sugiere que la concentración de péptidos en este caso parece ser más baja, pero esto podría deberse a otros factores no necesariamente asociados con el método de conservación de la muestra.

La gran variabilidad que presenta el perfil venómico entre individuos distintos de una misma especie de cono se encuentra bien establecida (Romeo et al., 2008; Abalde et al., 2018; Pardos-Blas et al., 2019).

Esto se debe a que cada individuo no expresa en todo momento todas las conotoxinas que tiene en su genoma. Si bien hasta la fecha no hay una explicación plausible a este hecho, las diversas hipótesis apuntan a factores medioambientales, a la variabilidad en la disponibilidad de los posibles tipos de presas en su hábitat, o al propio estado físico del cono (si ha comido recientemente o si, por el contrario, necesita alimentarse). La variabilidad entre las masas encontradas en cada una de las muestras podría corresponder a este hecho, ya que cada muestra (RNA-Later, MeCN 20% + 0.1% FA, etanol) pertenecen a individuos distintos. No obstante, el perfil de las muestras preservadas en RNA-Later y MeCN 20% + 0.1% FA muestra alta similitud en la mayoría de los picos más intensos.

En resumen, los datos muestran que de los métodos utilizados ampliamente en los Museos e Instituciones científicas para la preservación de conductos del veneno con vistas a estudios de transcriptómica y proteómica, tanto el RNA-Later como el MeCN 20% + 0.1% FA preservan bien las conotoxinas y mantienen la viabilidad de estas muestras para su estudio a posteriori. Por otra parte, aunque cabría pensar que las muestras preservadas en etanol dan un resultado mucho más pobre, se ha detectado un número de masas monoisotópicas comparable con el de muestras frescas sin preservar. Sin embargo, hay un número elevado de masas no comunes con el resto de las muestras, lo que podría indicar transformaciones químicas en las secuencias peptídicas. Esto último habría que confirmarlo con estudios posteriores, a fin de confirmar la viabilidad de muestras preservadas en etanol para estudios proteómicos.

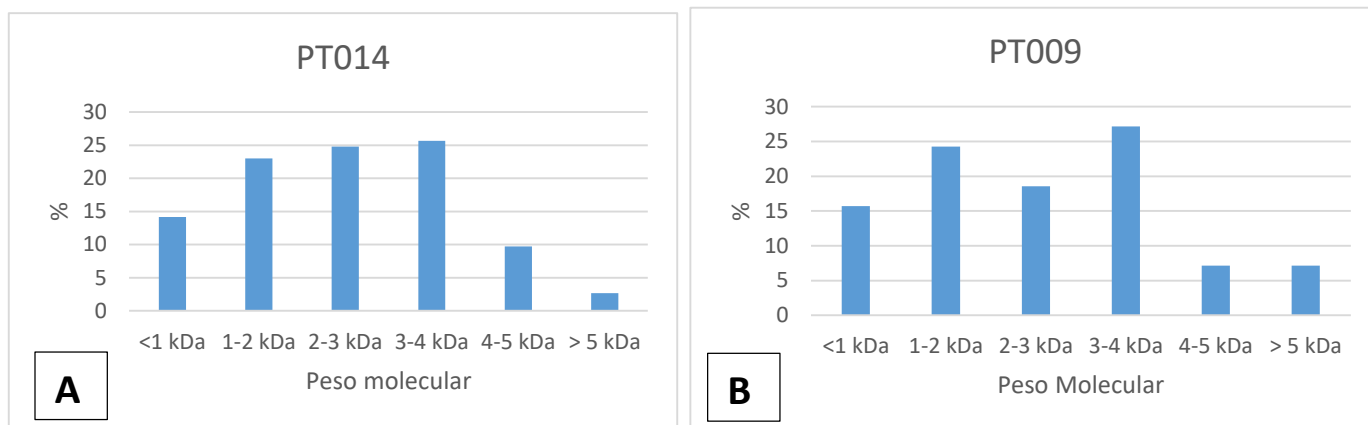
Lo que queda constatado es que las muestras de conducto venenoso conservadas en RNA-Later son adecuadas para estudios proteómicos, ya que este medio funciona incluso mejor que el tradicional consistente en preservar el conducto del veneno en MeCN 20% + 0.1% FA. Este resultado es de una gran importancia, pues abre un campo de actuación muy importante por las colaboraciones que el grupo de investigación mantiene con el Museo de Ciencias Naturales de Madrid (MNCN-CSIC), el Muséum d'Histoire Naturelle de París (MNHN) y otras instituciones. Dichos museos preservan conductos de veneno de un gran número de especies en RNA-Later para estudios transcriptómicos. Ahora se abre la puerta a la posibilidad de realizar estudios de Venómica integrada (proteotranscriptómica o proteómica/transcriptómica/genómica) usando las mismas muestras para la identificación de conotoxinas, la comprensión de su papel ecológico y los mecanismos de acción sobre sus dianas moleculares.

#### **7.4. Efecto del proceso de SPE sobre el contenido y perfil de conotoxinas.**

Tal como se ha mencionado en el apartado anterior, las muestras preservadas en RNA-Later, acetonitrilo y etanol, una vez extraídas, fueron sometidas a un proceso de extracción en fase sólida (SPE) a fin de eliminar restos de sales y otras sustancias, a fin de muestras enriquecidas en los péptidos de interés, dado el carácter polar de los mismos.

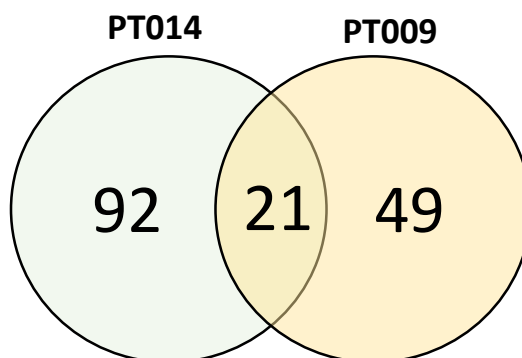


Para obtener más información sobre la eficiencia de los métodos de extracción y purificación de las conotoxinas, se realizaron análisis comparativos mediante UPLC-MS del perfil de conotoxinas de los extractos de conductos del veneno en ejemplares frescos (sin tratar con ningún medio de conservación) de manera directa (muestra PT014), y por otra parte sometiéndolo a un proceso de extracción en fase sólida (muestra PT009).



**Figura 17:** Distribución de masas monoisotópicas: (A): muestra PT014. (B): muestra PT009.

El análisis de espectrometría de masas para la muestra PT014 (sin pasar por un sistema SPE) permitió identificar 113 masas monoisotópicas con una distribución de masas en la que el 14,5%, de las masas son inferiores a 1 kDa, 23% están entre 1 y 2 kDa, 24,8% están entre 2 y 3 kDa, 25,7% están entre 3-4 kDa, 9,73% están entre 4 y 5 kDa y solo 2,65% de las masas son superiores a 5 kDa (Figura 17.A). Por otra parte, el análisis de las masas monoisotópicas de la muestra PT009 permitió identificar solamente 70 masas mono-isotópicas. No obstante, la distribución de masas mostró ser muy similar a la anterior, pero con un aumento significativo en las masas con una masa superior a 5 kDa (Figura 17.B): 7,1% frente 2,7 % en las muestras sin pasar por SPE. El resto de las masas tiene distribuciones porcentuales similares, tal y como se aprecia en la figura 17.

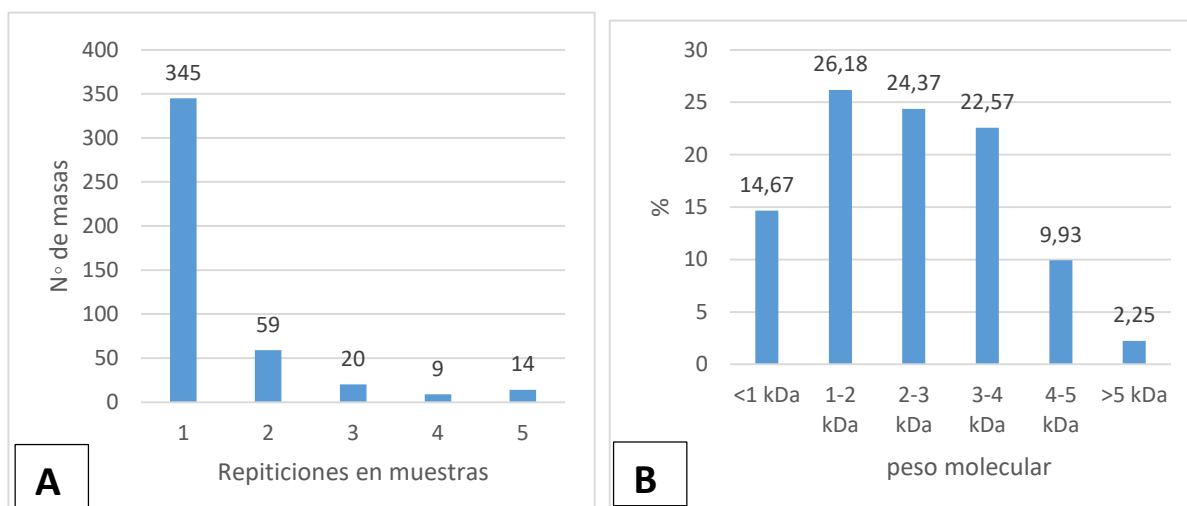


**Figura 18:** Superposición de masas mono-isotópicas entre muestra PT009 y PT014.

El análisis comparativo de las masas monoisotópicas en una y otra muestra permite constatar la existencia de 21 masas monoisotópicas comunes en ambas muestras (Figura 18). Si bien este porcentaje es comparable al obtenido cuando se comparaban los distintos métodos de preservación (ver sección 7.2), y resulta coherente con la variabilidad existente en el perfil de conotoxinas expresadas por cada individuo

### 7.5. Estudio de la variabilidad del perfil venómico entre individuos.

Con el objetivo de estudiar la variabilidad del perfil de las conotoxinas, se analizaron los extractos del conducto del veneno de 5 individuos (PT012, PT013, PT014, PT015 y PT016) mediante UPLC/MS (extracción directa sin conservación previa y sin SPE).



**Figura 19:** (A) Repetición de masas monoisotópicas entre individuos (B): la distribución de masas monoisotópicas de las 5 muestras.

El análisis de cada muestra del conducto del veneno de los 5 individuos indicados mediante UPLC/MS condujo a los siguientes resultados:

Muestra	PT012	PT013	PT014	PT015	PT016	TOTAL
Nº de masas	84	74	98	110	81	447

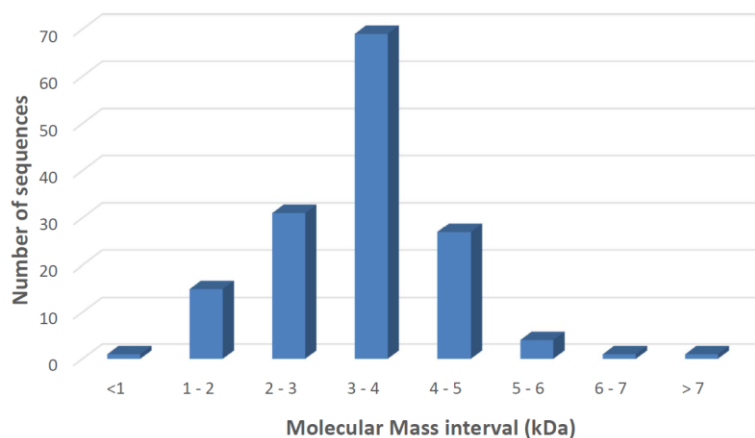
La mayoría de masas están comprendidas entre 300 y 5000 Da (Figura 19.B), con los porcentajes respectivos que se indican en la figura. Solo un 2,25% de las masas tiene un peso molecular superior a 5000 Da. Entre las 447 masas monoisotópicas totales, 345 de ellas son únicas, es decir que se encuentran solo en una muestra de entre las 5 y no se repiten en las otras; 59 de las masas se identifican solo en 2 muestras; 20 se identifican en 3 muestras; 9 se identifican en 4 muestras, y 14 masas monoisotópicas se encuentran presentes en las 5 muestras (Figura 19.A). La conclusión es que un número importante de componentes del

veneno se encuentra presente en un solo individuo, y que el número de componentes compartido con otros congéneres es relativamente pequeño en proporción.

#### **7.6. Identificación de conotoxinas a partir de las masas monoisotópicas.**

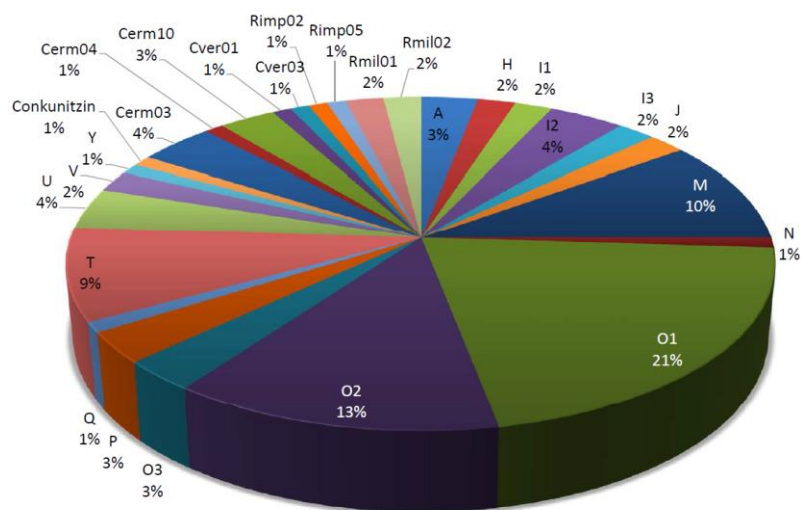
Se realizó un análisis de las masas monoisotópicas identificadas para un conjunto de 12 muestras analizadas por UPLC-MS de conductos venenosos de *L. ventricosus* correspondientes a un total de 17 ejemplares. El conjunto de todas las masas se registró en un único archivo. Las masas duplicadas se eliminaron mediante la herramienta disponible en el portal Conoserver (Remove Duplicate Masses in Mass List). Se obtuvo un archivo conteniendo un total de 531 masas monoisotópicas únicas.

Por otra parte, se utilizó la herramienta ConoMass en el portal Conoserver para realizar la identificación de las masas. Para ello, se utilizó como base de datos de referencia el transcriptoma del conducto del veneno de *L. ventricosus* recientemente publicado (Pardos-Blas et al., 2021), el cual contiene un total de 245 secuencias peptídicas. En un primer paso, se construyó un archivo .fasta con las secuencias de los péptidos maduros extraídos del transcriptoma de *L. ventricosus* con una longitud mayor o igual usando la herramienta ConoPrec. Se obtuvieron 210 secuencias en total. Dicho archivo se utilizó como entrada de la herramienta Differential PTM Masses, a fin de obtener las masas de todas las secuencias conteniendo las modificaciones postraduccionales (PTM) más frecuentes. Estas fueron: amidación N-terminal, bromación de triptófano, carboxilación de glutamato, e hidroxilación de valina y prolina. En un segundo paso, se utilizó la lista de masas monoisotópicas y el archivo de masas de secuencias con las correspondientes PTM generado en el primer paso. Se usó una tolerancia de 0.1 Da y se ejecutó el programa. El resultado fue un listado de masas observadas y calculadas para las distintas secuencias identificadas. El resultado se descargó en formato Excel, y se examinaron manualmente todas las entradas obtenidas. En caso de obtener más de un resultado para una masa concreta, se seleccionaron aquel o aquellos con diferencia de masa mínima. El listado de salida de este programa se encuentra en el Anexo. En total se consiguieron identificar 149 secuencias, con masas comprendidas entre los 823,33 y los 7377,88 Da. Las PTM presentes más abundantes fueron la amidación N-terminal, la carboxilación de glutamato y la hidroxilación de prolina (casi tan abundante como la de valina), y finalmente la bromación de triptófano. En todos los casos se considera que todos los residuos cisteína presentes se encuentran formando puentes disulfuro. En 25 casos no se observaron PTM aparte de la formación de puentes disulfuro. El error promedio en la asignación de las masas fue de 0.035 Da. La figura 20 muestra la distribución de masas moleculares de las conotoxinas identificadas. Puede apreciarse en la misma que las conotoxinas identificadas más abundantes poseen masas moleculares comprendidas entre los 3000 y los 4000 Da. De hecho, las conotoxinas con masas entre 2000 y 5000 Da representan el 85% del total de las conotoxinas observadas.



**Figura 20:** Distribución de masas moleculares de las conotoxinas identificadas.

Una vez realizada la identificación de las conotoxinas con sus correspondientes PTM, es posible evaluar la abundancia relativa de las distintas superfamilias presentes. Así podemos representar el número de secuencias asignadas a una superfamilia en particular para hacernos una idea de la magnitud relativa de su presencia en el proteoma. Esto es lo que aparece representado en la figura 21.



**Figura 21:** Distribución relativa de las superfamilias correspondientes a las conotoxinas identificadas.

Se han identificado conotoxinas pertenecientes a 27 superfamilias distintas. Según se deduce de la figura 21, la mayor parte de las conotoxinas identificadas en el proteoma pertenecen a las superfamilias O1 (21%) y O2 (13%), y en menos medida las superfamilias M (10%) y T (9%). El conjunto de conotoxinas pertenecientes a estas cuatro superfamilias suma más de la mitad del total de las presentes (53%). Las

secuencias de las conotoxinas identificadas, así como sus modificaciones postraduccionales y la asignación de cada conotoxina a una superfamilia se encuentran en el Anexo III del presente trabajo.

Si bien se han identificado con éxito 149 secuencias de conotoxinas en el conducto del veneno de *L. ventricosus*, esto sólo representa la asignación del 28% del total de las masas monoisotópicas registradas. Las 149 conotoxinas no obstante cubren el 61% de las presentes en el transcriptoma del conducto del veneno, y el 71% de las de menos de 70 aminoácidos. Esto indica una buena cobertura del transcriptoma. El hecho de que queden muchas masas monoisotópicas sin asignar es atribuible a que se ha utilizado como referencia el transcriptoma de un solo individuo, mientras que se han medido las masas correspondientes al veneno combinado de 17 ejemplares. En caso de disponer de transcriptomas de más de un individuo, sería razonable pensar que la tasa de identificación de masas aumentaría de forma automática. Quedaría por ver cuantos transcriptomas serían necesario para cubrir un número elevado de masas, en función de la variabilidad observada entre individuos de la misma especie. Por otra parte, el uso de la técnica “shotgun proteomics”, también conocida como “bottom-up”, serviría para aumentar la cobertura identificando péptidos y proteínas de más alta masa molecular también presentes en el conducto del veneno. Esta técnica implica la reducción de los péptidos y la alquilación de los residuos cisteína con iodoacetamida, y posterior digestión enzimática con tripsina. Los péptidos resultantes se analizan mediante HPLC-MS/MS, y los péptidos y proteínas presentes se reconstruyen a partir de los fragmentos identificados en la mezcla usando para ello una base de datos de secuencias específica. Esta técnica resultaría complementaria del análisis UPLC-MS aquí presentado, y se considera un trabajo experimental a completar en el futuro.

## 8. Conclusiones

En los últimos años, los estudios proteómicos están adquiriendo una gran relevancia en lo que hace referencia a su aplicación en los estudios de venómica. En este trabajo se tomó como punto de partida los análisis del transcriptoma del conducto venenoso de *Lautoconus ventricosus*, se mantuvieron los ejemplares en condiciones controladas de temperatura, aireación, salinidad y pH para determinar su capacidad de adaptación a la vida en cautividad. Estos ejemplares se usaron para realizar análisis proteómicos mediante UPLC/MS para evaluar diferentes métodos de conservación y extracción de muestras del conducto del veneno, así como para identificar las distintas conotoxinas presentes en el conducto del veneno.

- 1) Los ejemplares de *L. ventricosus* se adaptaron bien a las condiciones físico-químicas ambientales y de alimentación establecida en el acuario donde se pusieron. El paso por múltiples fases de puesta de huevos mostró buena evidencia de su adaptación.
- 2) Preservación del conducto del veneno: No se aprecian diferencias significativas en el número de masas moleculares correspondientes a péptidos detectadas en muestras conservadas en distintos medios (RNA-Later, etanol, 20% MeCN + 0.1% FA). No obstante, el contenido peptídico parece inferior en la muestra conservada en etanol. Las muestras conservadas en RNA-Later y 20% MeCN + 0.1% FA mantienen mejor la integridad del perfil peptídico.
- 3) La extracción directa del conducto del veneno proporciona mejor resultado con respecto al número de masas isotópicas detectadas en comparación con las muestras extraídas mediante cartuchos SPE. Se observa en este último caso la pérdida de un número significativo de masas correspondientes a otros tantos componentes peptídicos de la muestra en cuestión.
- 4) El perfil de las conotoxinas presentes en el veneno difiere considerablemente entre individuos de la misma especie.
- 5) Del análisis proteómico del extracto de 12 muestras del conducto venenoso de *L. ventricosus* correspondientes a un total de 17 ejemplares se obtuvieron un total de 531 masas monoisotópicas únicas. De estas masas se han conseguido identificadas 149 de ellas correspondientes a otras tantas conotoxinas cuyas secuencias aparecen en el transcriptoma. La mayor parte de ellas contienen modificaciones postraduccionales de distinto tipo.
- 6) Las conotoxinas identificadas se encuentran repartidas entre un total de 27 superfamilias distintas. Más de la mitad de ellas se encuentran mayormente distribuidas en tan solo 4 superfamilias: O1 (21%), O2 (13%), M (10%), y T (9%).

## 9. Perspectivas de Futuro

Las informaciones generadas por el estudio de transcriptoma de las conotoxinas de *Lautoconus ventricosus* han conducido la investigación al estudio directo de las conotoxinas mediante estudios proteómicos. A partir de los resultados aportados desde este trabajo las perspectivas futuras se orientan en varias direcciones.

En un primer lugar estarían las condiciones de mantenimiento de los ejemplares de *Lautoconus ventricosus* en el acuario. En concreto, se podría estudiar el efecto de los cambios de las condiciones de aireación, salinidad, temperatura y pH sobre el índice de la mortalidad de los individuos y evaluar estas condiciones con respecto a los períodos reproductivos de puesta de huevos. La disponibilidad de tener cápsulas ovígenas de esta especie en condiciones controladas abre la posibilidad de realizar estudios del desarrollo embrionario a distintos niveles.

En segundo lugar, serían las perspectivas que se abren tras determinar que los perfiles proteómicos del conducto del veneno no se ven alterados en gran medida por el uso de distintos métodos de conservación de muestras, particularmente aquellas preservadas en RNA-Later. Esto permitirá en un futuro acceder a muestras que normalmente son muy difíciles de conseguir, por proceder de lugares remotos o de aguas muy profundas, con lo que se podrá expandir el conocimiento de la diversidad de conotoxinas entre las numerosas especies de conos existentes.

Se realizarán estudios de HPLC-MS/MS de los extractos del conducto del veneno tras el tratamiento de reducción, alquilación y digestión enzimática. Dichos estudios servirán para aumentar la cobertura identificando péptidos y proteínas de masa molecular más elevada, también presentes en el conducto del veneno. Esta técnica complementaría los análisis UPLC-MS aquí presentados.

Finalmente, una vez identificados los componentes presentes en el veneno de *L. ventricosus* se puede evaluar la estructura y potencial bioactividad de los mismos usando herramientas bioinformáticas. Posteriormente se podría llevar a cabo la síntesis de algunos conopéptidos in vitro o mediante técnicas de ADN recombinante. Tras su aislamiento y purificación, se podría determinar su estructura mediante técnicas espectroscópicas (RMN) y llevar a cabo ensayos de bioactividad frente a distintos canales iónicos y evaluar posibles dianas moleculares.

## 10. Bibliografia

- Abalde S, Tenorio MJ, Afonso CML, Zardoya R. 2018. Conotoxin diversity in *Chelyconus ermineus* (Born, 1778) and the convergent origin of piscivory in the Atlantic and Indo-Pacific cones. *Genome Biol. Evol.*, 10, 2643–2662. doi: 10.1093/gbe/evy150.
- Becker S, Terlau H. 2008. Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79(1): 1-9. doi: 10.1007/s00253-008-1385-6.
- Bingham JP, Mitsunaga E, Bergeron ZL. 2010. Drugs from slugs – past, present and future perspectives of omega-conotoxin research. *Chem Biol Interact*, 183(1): 1-18. doi: 10.1016/j.cbi.2009.09.021.
- Board W.E. World Register of Marine Species. Available online: <http://www.marinespecies.org> (último acceso, 14 May 2021).
- Bon C. 2000. Les venins. Paris: *Elsevier*, 225.
- Buczek O, Bulaj G, Olivera BM. 2005. Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cell Mol. Life Sci.*, 62(24): 3067-79. doi: 10.1007/s00018-005-5283-0.
- Bulaj G, Olivera BM. 2008. Folding of conotoxins: formation of the native disulfide bridges during chemical synthesis and biosynthesis of *Conus* peptides. *Antioxid Redox Signal.*, 10(1): 141-55. doi: 10.1089/ars.2007.1856.
- Daly NL, Craik DJ. 2009. Structural studies of conotoxins. *IUBMB Life*, 61(2): 144-50. doi: 10.1002/iub.
- Endean R, Rudkin C. 1965. Further studies of the venoms of *Conidae*. *Toxicon*, 2: 225-49. doi: 10.1016/0041-0101(65)90021-8
- Endean R, Gyr P, Parish G. 1974. Pharmacology of the venom of the gastropod *Conus magus*. *Toxicon*, 12(2): 117-29. doi: 10.1016/0041-0101(74)90235-9.
- Endean R, Gyr P, Surridge J. 1979. The effects of crude venoms of *Conus magus* and *Conus striatus* on the contractile response and electrical activity of guinea-pig cardiac musculature. *Toxicon*, 17(4): 381-95. doi: 10.1016/0041p.-0101(79)90266-6.
- Essack M, Bajic VB, Archer JA. 2012. Conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Mar. Drugs*, 10(6): 1244-1265. doi: 10.3390/md10061244.
- Favreau P, Stöcklin R. 2009. Marine snail venoms: use and trends in receptor and channel neuropharmacology. *Curr Opin Pharmacol.*, 9(5): 594-601. doi: 10.1016/j.coph.2009.05.006.
- Goyffon M, Heurtault J. 1995. La fonction venimeuse, *Ed. Masson*, Paris. 45-56
- Heurtault, J, Goyffon, M, Stockmann, R. La fonction venimeuse et les venins. *Annales de l'Institut Pasteur / Actualités*, 1999. 10(2), 147–160. doi:10.1016/s0924-4204(99)80030-4.
- Gray WR, Olivera BM, Cruz LJ. 1988. Peptide toxins from venomous *Conus* snails. *Annu Rev Biochem.*, 57: 665-700. doi: 10.1146/annurev.bi.57.070188.003313.



Gmelin J.F. 1791. Vermes. In: Gmelin J.F. (Ed.) *Caroli Linnaei Systema Naturae per Regna Tria Naturae*, Ed. 13. Tome 1(6).pp.3021-3910. Available online at <http://www.biodiversitylibrary.org/item/83098#5>

Halai R, Craik DJ. 2009. Conotoxins: natural product drug leads. *Nat. Prod. Rep.*, 26(4): 526-36. doi: 10.1039/b819311h.

Kaas Q, Westermann JC, Craik DJ. 2010. Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer. *Toxicon*, 55(8): 1491-1509. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.03.002.

Kaas Q, Westermann JC, Halai R, Wang CK, Craik DJ. 2008. ConoServer, a database for conopeptide sequences and structures. *Bioinformatics*, 24(3): 445-446. doi: 10.1093/bioinformatics/btm596.

Layer RT, McIntosh JM. 2006. Conotoxins: Therapeutic Potential and Application. *Mar. Drugs*, 4(3): 119-142. doi: 10.3390/md403119.

Le Gall F, Favreau P, Benoit E, Richard G, Molgó J. 1999. Les venins de cônes: source de toxines qui interagissent avec les canaux sodium dépendant du potentiel de membrane [*Conus* venoms: a source of toxins which interact with membrane- potential-dependent sodium channels]. *J Soc Biol.*, 193(6): 481-93.

Le Gall F, Favreau P, Richard G. 1999. Cônes et toxines. *Pour la science*, 261:56-62.

Le Gall F, Favreau P, Richard G, Benoit E, Letourneux Y, Molgó J. 1999. Biodiversity of the genus *Conus* (Fleming, 1822): a rich source of bioactive peptides. *Belg. J. Zool.*, 129:17-42.

Lindner G. 2012. Guide des coquillages marins : Plus de 1000 espèces des mers du monde.- 2ème éd. Ed. *Delachaux et Niestlé*, Paris, 320 p.

Lipinski CA. 2004. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol.*, 1(4): 337-41. doi: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007.

Marsh, H. 1977. The radular apparatus of *Conus*. *J. Mollus. Stud.*, 43:1-11. Doi: 10.1093/oxfordjournals.mollus.a065356

McIntosh JM, Jones RM. 2001. Cone venom-from accidental stings to deliberate injection. *Toxicon*, 39(10): 1447-1451. doi:10.1016/s0041-0101(01)00145-3.

McIntosh JM, Santos AD, Olivera BM. 1999. *Conus* peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annu. Rev. Biochem.*, 68: 59-88. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.59

Norton RS, Olivera BM. 2006. Conotoxins down under. *Toxicon*, 48(7): 780-798. doi:10.1016/j.toxicon.2006.07.022.

Olivera BM., Rivier J, Clark C, Ramilo CA, Corpuz GP, Abogadie FC, Mena EE, Woodward SR, Hillyard R, Cruz LJ. 1990. *Science*, 249: 257–263. doi: 10.1126/science.2165278.

Olivera BM. 2006. *Conus* peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *J. Biol Chem.*, 281(42): 31173-31177. doi:10.1074/jbc.R600020200.

Olivera BM, Teichert RW. 2007. Diversity of the neurotoxic *Conus* peptides: a model for concerted pharmacological discovery. *Mol Interv.*, 7(5): 251-260. doi:10.1124/mi.7.5.7.

- Olivera BM, Cruz LJ. 2001. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon*, 39(1): 7-14. doi:10.1016/s0041-0101(00)00157-4.
- Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, Varga J, Rivier J, de Santos V, Cruz LJ. 1985. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science*, 230(4732): 1338-43. doi: 10.1126/science.4071055.
- Pardos-Blas JR, Irisarri I, Abalde S, Tenorio MJ, Zardoya R. 2019. Conotoxin Diversity in the Venom Gland Transcriptome of the Magician's Cone, *Pionoconus magus*. *Mar. Drugs*, 17(10): 553. doi: 10.3390/md17100553.
- Pardos-Blas JR, Irisarri I, Abalde S, Afonso CML, Tenorio MJ, Zardoya R. 2021. The genome of the venomous snail *Lautoconus ventricosus* sheds light on the origin of conotoxin diversity. *Gigascience*, 10(5): giab037. doi:10.1093/gigascience/giab037
- Peng C, Huang, Y, Bian C, Li J, Kiu J, Zhang K, You X, Linz Z, He Y, Chen J, Lv Y, Ruan Z, Zhang X, Yi Y, Li Y, Lin X, Gu R, Xu J, Yang, J, Fan C, Yao G, Chen J-S, Jian H, Gao, B, Shi Q. 2021. The first *Conus* genome assembly reveals a primary genetic dogma of conopeptides in *C. betulinus*. *Cell Discov.*, 7: 11. doi:10.1038/s41421-021-00244-7.
- Peters H, O'Leary BC, Hawkins JP, Carpenter KE, Robert CM. 2013. *Conus*: first comprehensive conservation red list assessment of a marine gastropod mollusc genus. *PLoS One*, 8(12): e83353. doi:10.1371/journal.pone.0083353
- Puillandre, N., Samadi, S., Boisselier, M. C., Sysoev, A. V., Kantor, Y. I., Cruaud, C., Couloux, A., & Bouchet, P. 2008. Starting to unravel the toxoglossan knot: molecular phylogeny of the "turrids" (Neogastropoda: Conoidea). *Molecular phylogenetics and evolution*, 47(3), 1122–1134. doi:10.1016/j.ympev.2007.11.007
- Puillandre, N, Koua, D, Favreau, P, Olivera, BM, Stöcklin, R. Molecular phylogeny, classification and evolution of conopeptides. 2012. *J. Mol. Evol.* 74(5-6): 297–309. Doi:10.1007/s00239-012-9507-2
- Puillandre N, Duda TF, Meyer C, Olivera, BM, Bouchet P. 2015. One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails. *J. Mollusc. Studies*, 81: 1-23. doi:10.1093/mollus/eyu055.
- Robinson SD, Safavi-Hemami H, McIntosh LD, Purcell AW, Norton RS, Papenfuss AT. 2014. Diversity of conotoxin gene superfamilies in the venomous snail, *Conus victoriae*. *PLoS One*, 9(2): e87648. doi:10.1371/journal.pone.0087648
- Robinson S. D., Norton R. S. 2014. Conotoxin Gene Superfamilies. *Mar. Drugs.*, 12: 6058-6101. doi:10.3390/md12126058
- Romeo C, Di Francesco L, Oliverio M, Palazzo P, Raybaudi-Massilia G, Ascenzi P, Polticelli F, Schinia ME. 2008. *Conus ventricosus* venom peptides profiling by HPLC-MS: A new insight into intraspecific variability. *J. Sep. Sci.*, 31: 488-498.

- Thapa P, Espiritu MJ, Cabaltega CC, Bingham JP. 2014. Conotoxins and their regulatory considerations. *Regul Toxicol Pharmacol.*, 70(1): 197-202. doi:10.1016/j.yrtph.2014.06.027
- Terlau H, Olivera BM. 2004. *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol Rev.*, 84(1): 41-68. doi:10.1152/physrev.00020.2003
- Vetter I, Lewis RJ. 2012. Therapeutic potential of cone snail venom peptides (conopeptides). *Curr Top Med Chem.*, 12(14): 1546-1552. doi:10.2174/156802612802652457.
- Vink S, Alewood PF. 2012. Targeting voltage-gated calcium channels: developments in peptide and small-molecule inhibitors for the treatment of neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.*, 167(5): 970-989. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02082.x
- Wang CZ, Chi CW. 2004. *Conus* peptides –a rich pharmaceutical treasure. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 36(11): 713-723. doi:10.1093/abbs/36.11.71

# ANEXOS

## ANEXO I: cromatogramas UPLC-MS

Muestra: **PT002**

Método de preservación: **ninguno**

SPE: **Si**

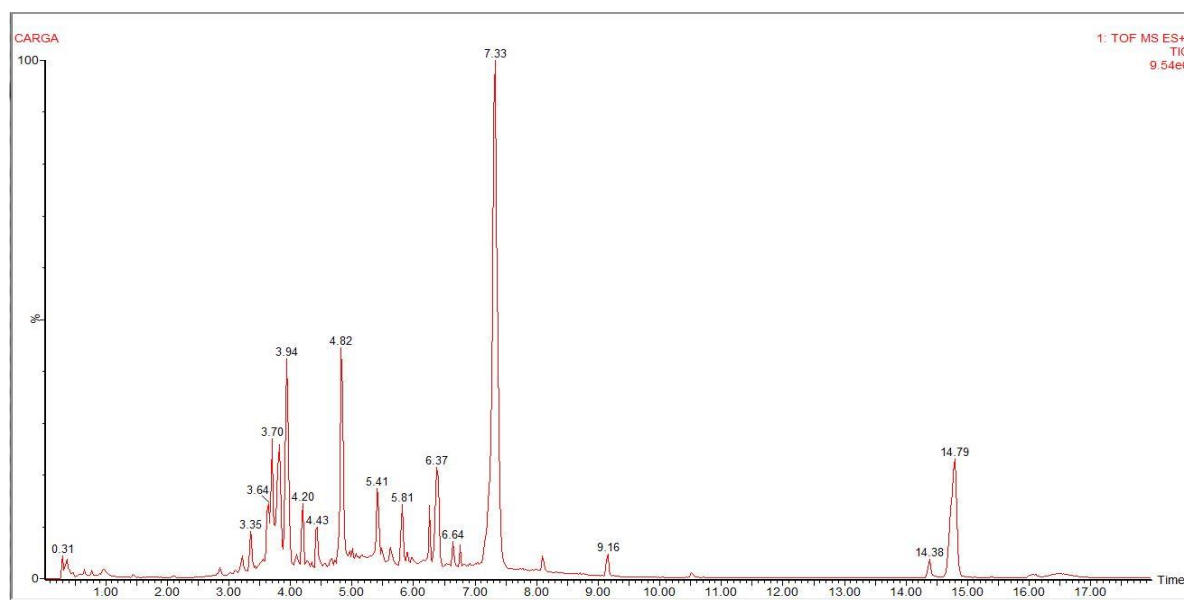


Figura S.1. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT002. Fracción: Carga.

Muestra: **PT002**

Método de preservación: **ninguno**

SPE: **Si**

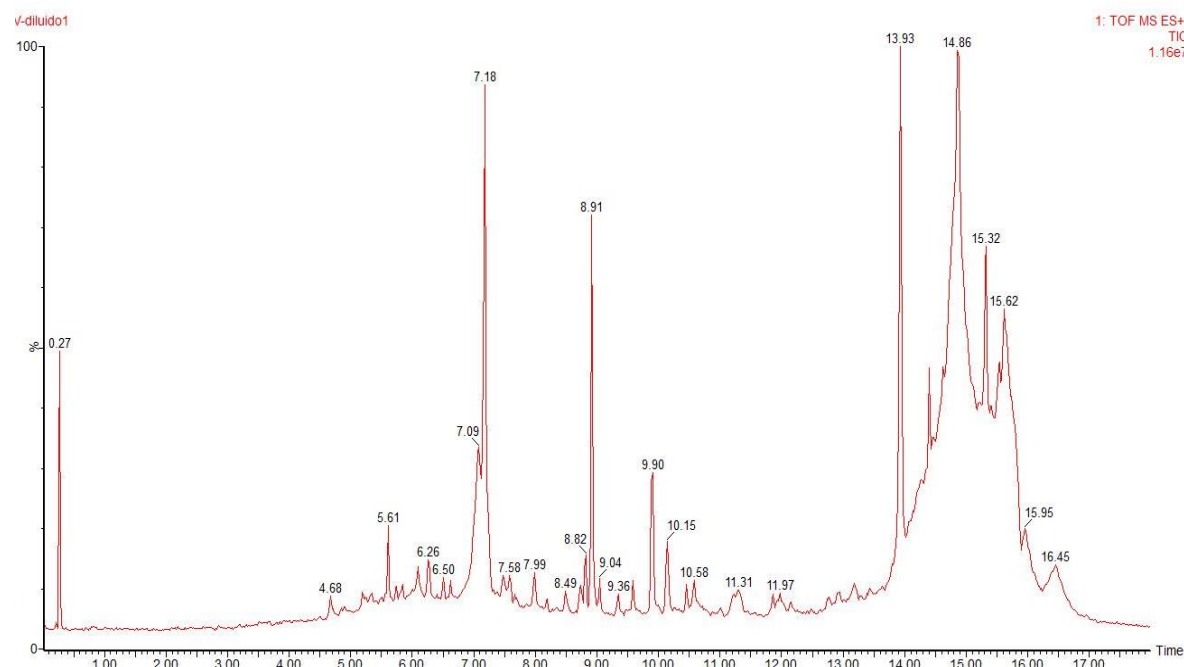


Figura S.2. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT002. Fracción: ELU-1.

Muestra: **PT003**

Método de preservación: **MeCN**

SPE: **Si**

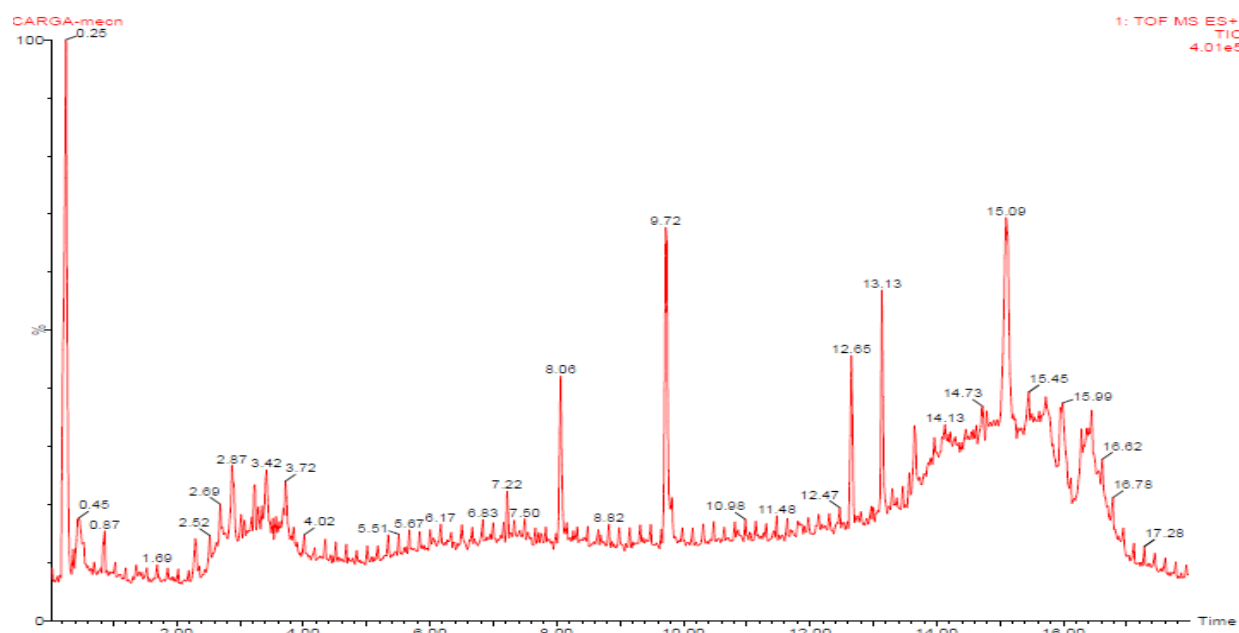


Figura S.3. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT003. Fracción: Carga.

Muestra: **PT003**

Método de preservación: **RNA-Later**

SPE: **Si**

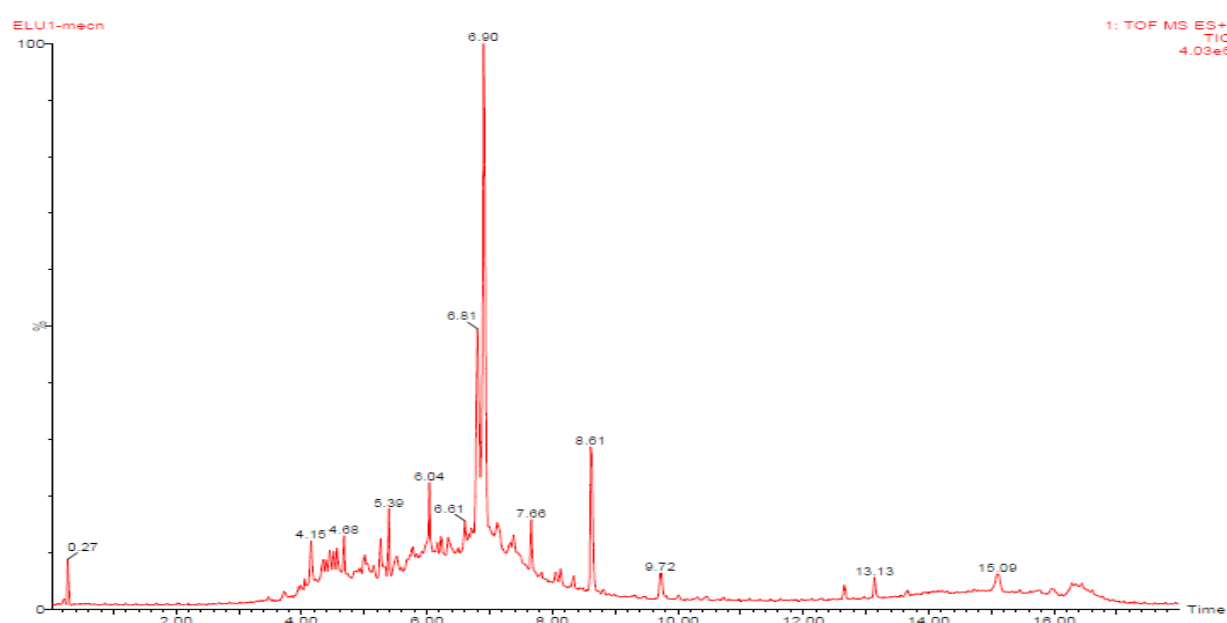


Figura S.4. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT003. Fracción: ELU-1.

Muestra: **PT004**

Método de preservación: **EtOH**

SPE: **Si**

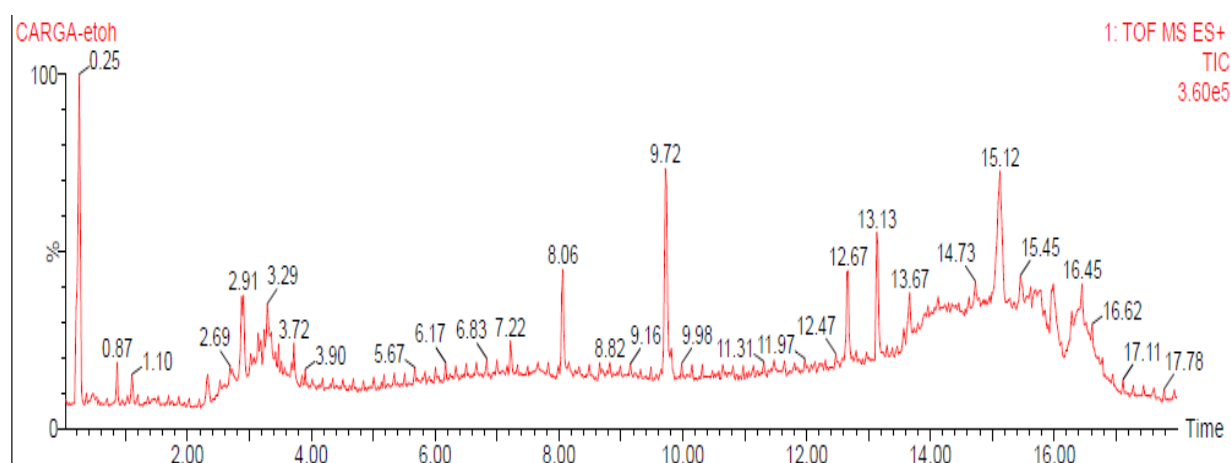


Figura S.5. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT004. Fracción: Carga.

Muestra: **PT004**

Método de preservación: **EtOH**

SPE: **Si**

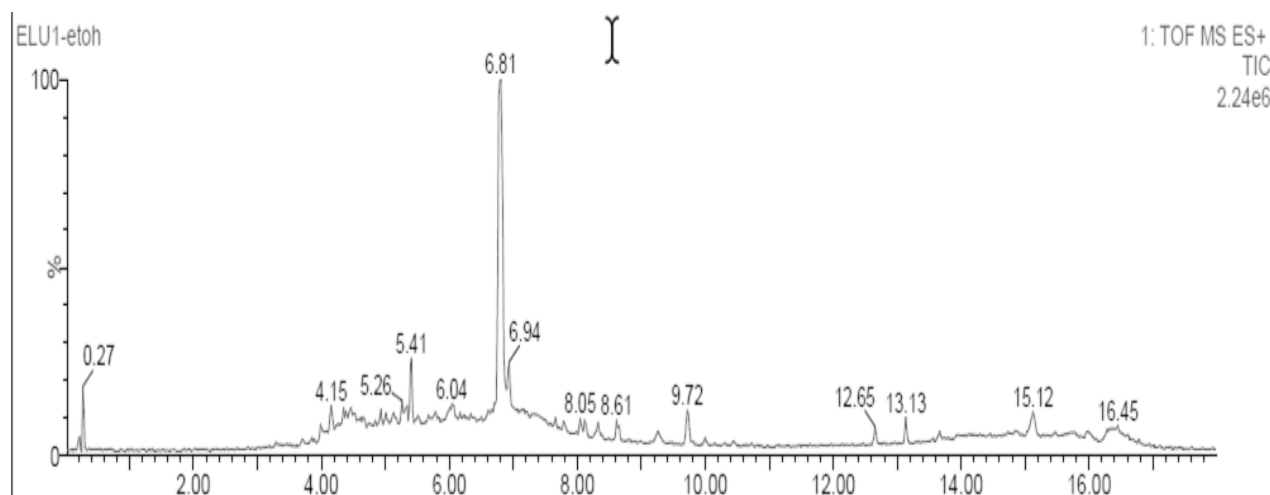


Figura S.6. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT004. Fracción: ELU-1.

Muestra: **PT005**

Método de preservación: **MeCN**

SPE: **Si**

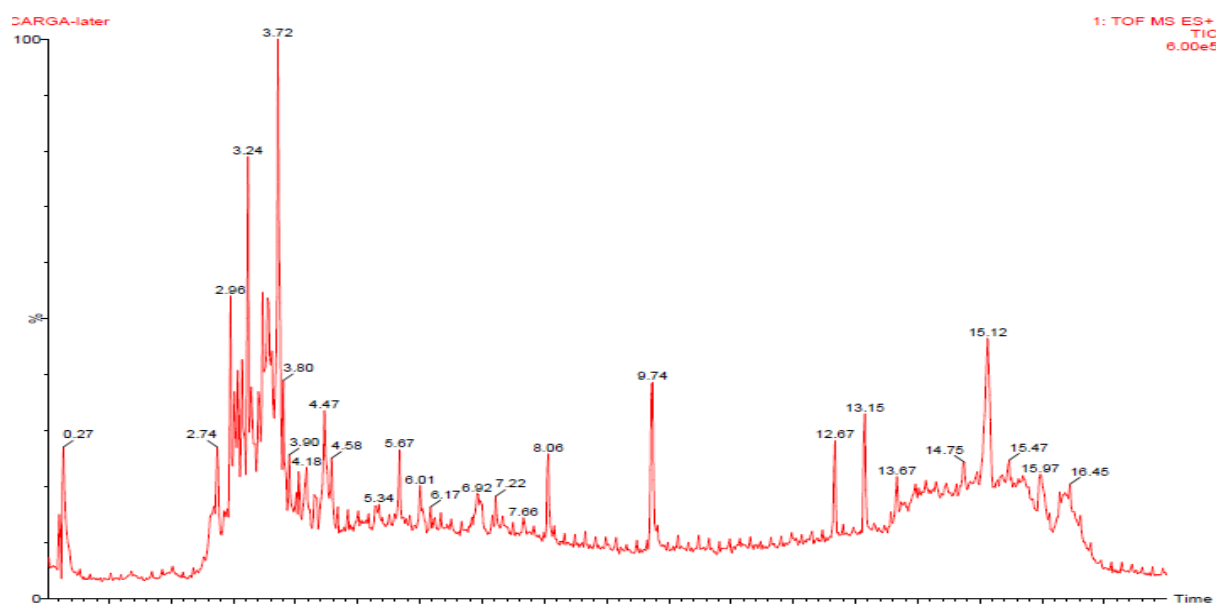


Figura S.7. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT005. Fracción: Carga.

Muestra: **PT005**

Método de preservación: **RNA-Later**

SPE: **Si**

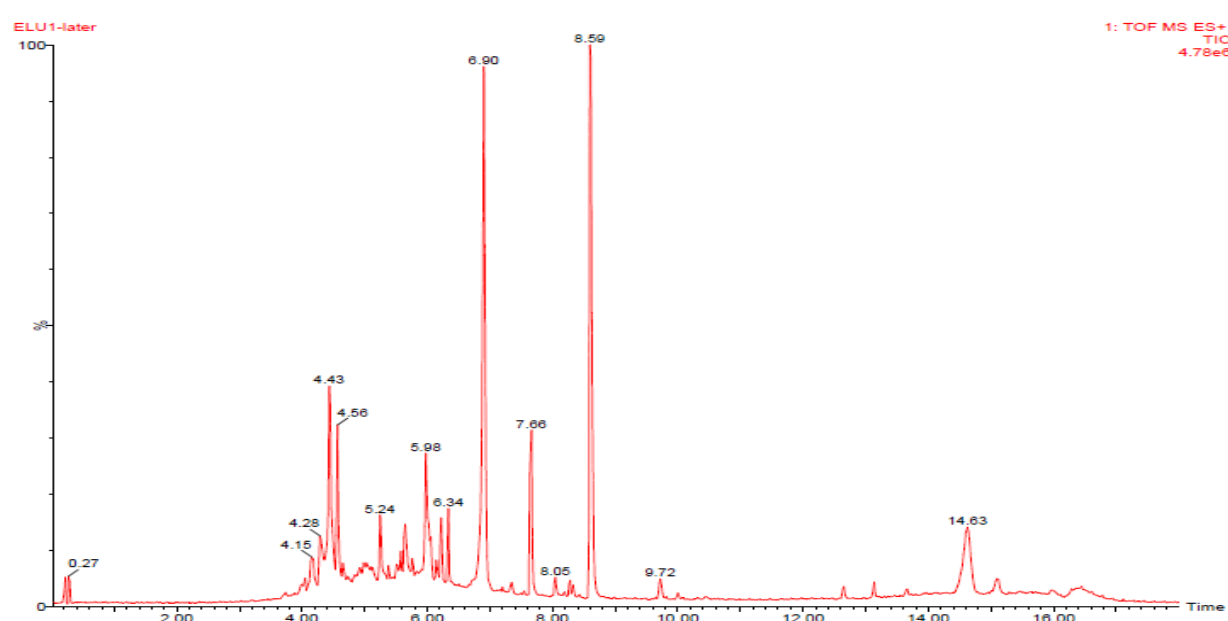


Figura S.8. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT005. Fracción: ELU-1.



Muestra: **PT006**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **Si**

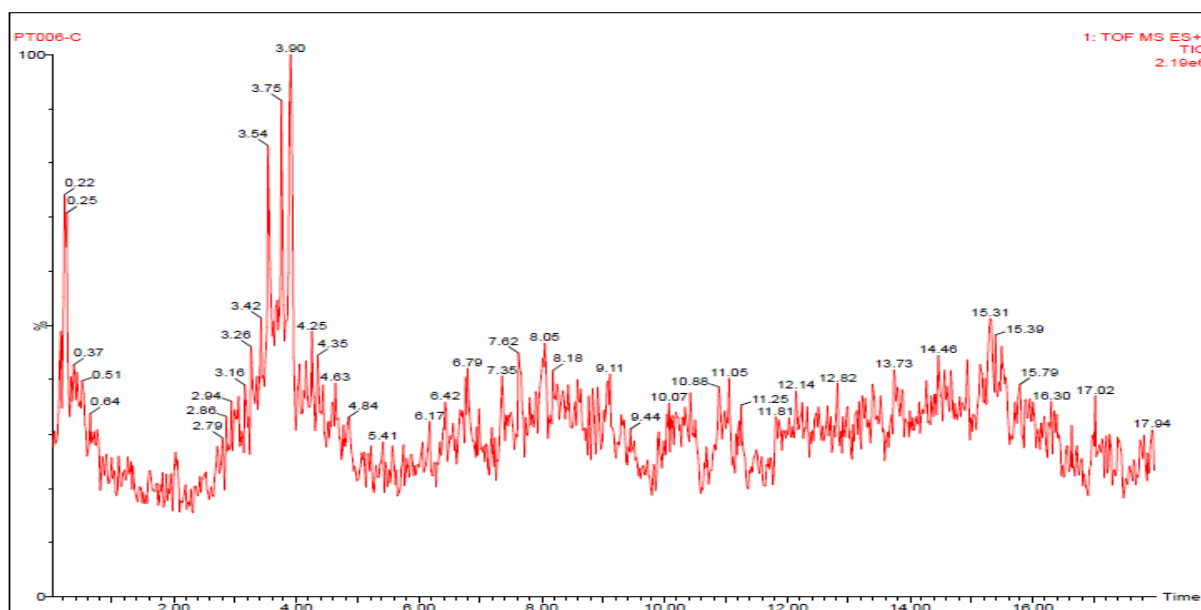


Figura S.9. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT006. Fracción: Carga.

Muestra: **PT006**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **Si**

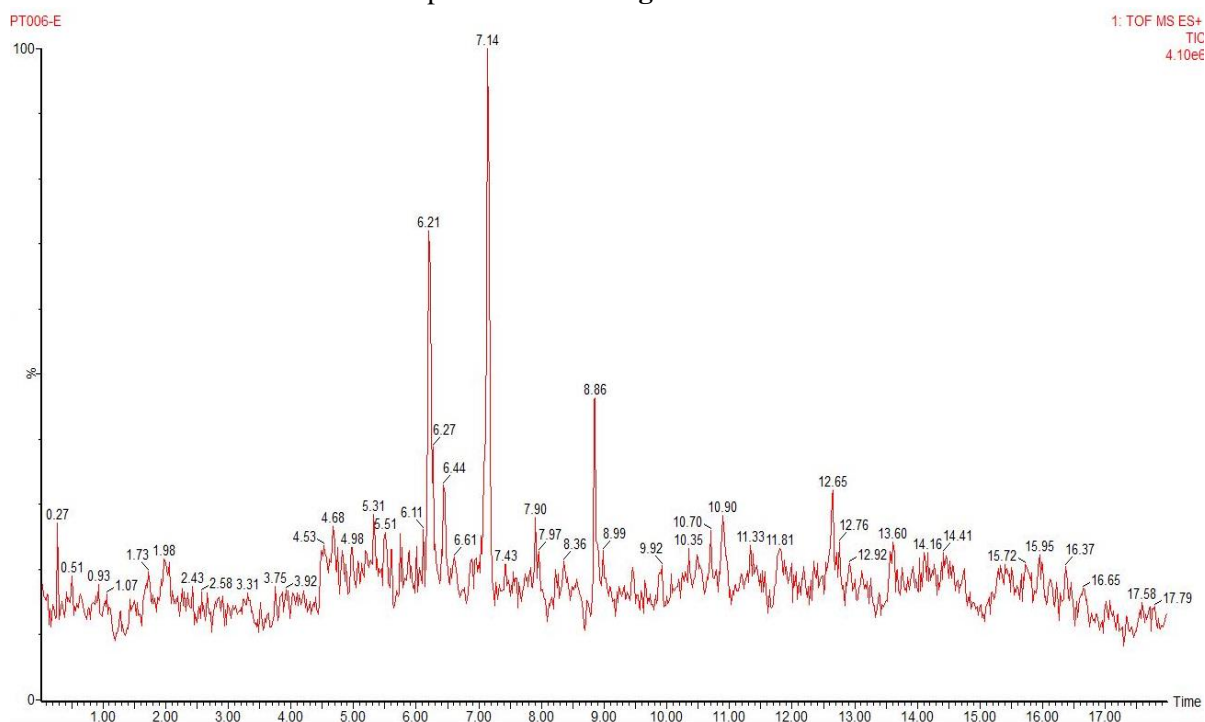


Figura S.10. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT006. Fracción: ELU-1.

Muestra: **PT007**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **Si**

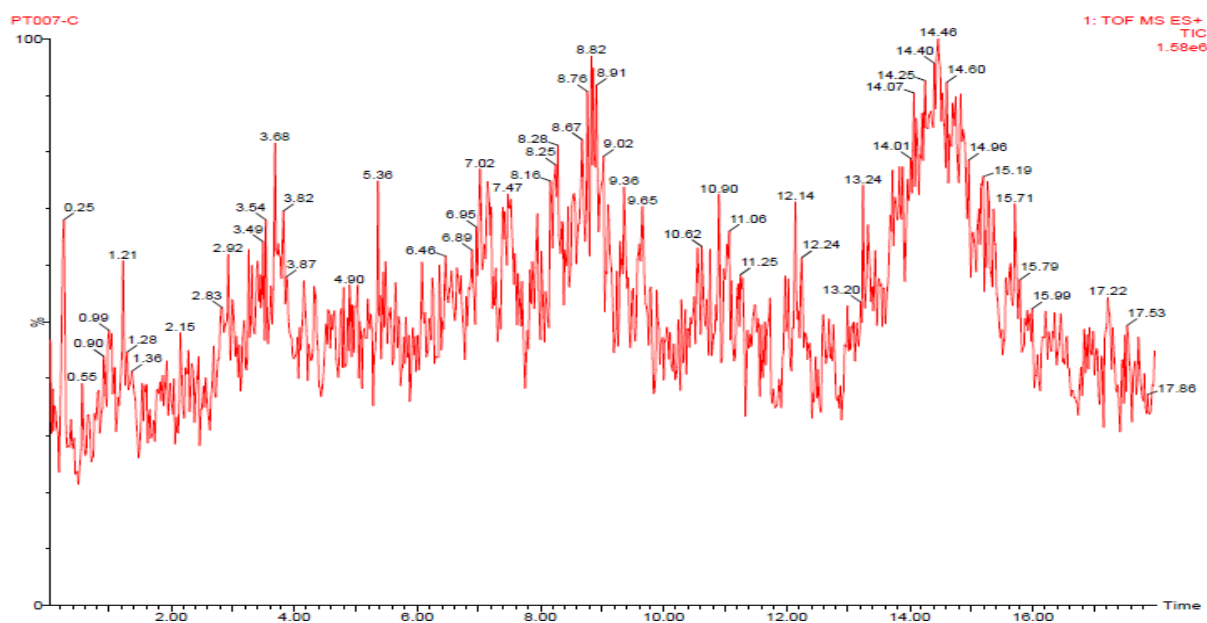


Figura S.11. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT007. Fracción: Carga.

Muestra: **PT007**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **Si**

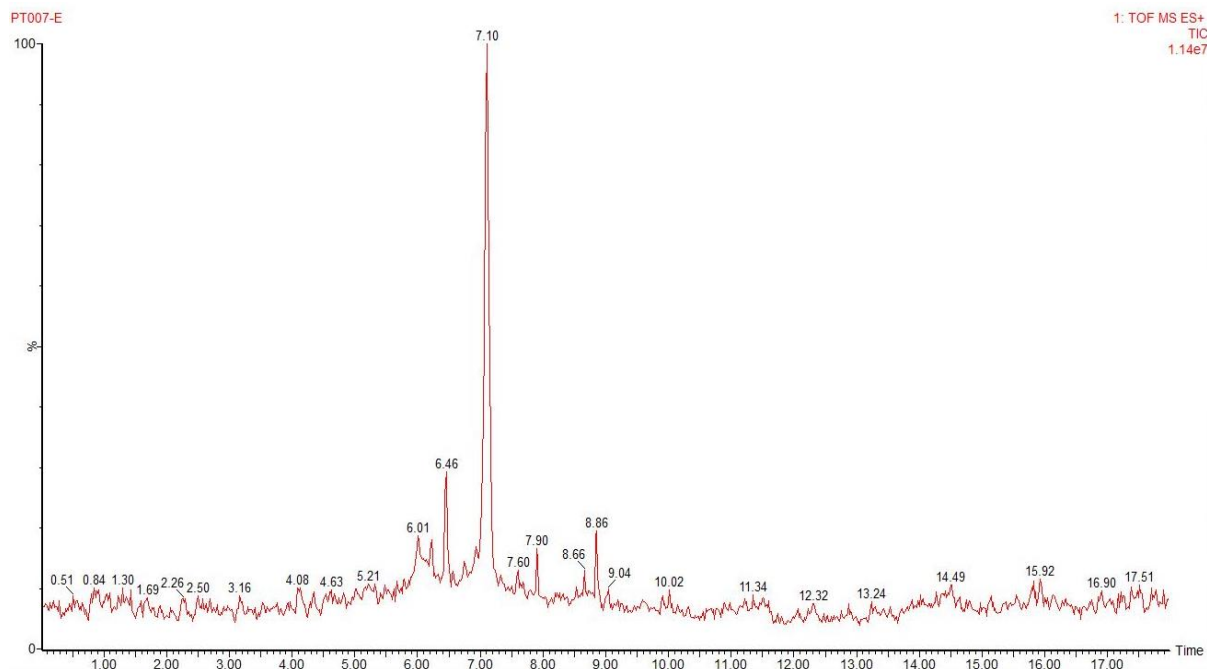


Figura S.12. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT007. Fracción: ELU-1.

Muestra: **PT008**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **Si**

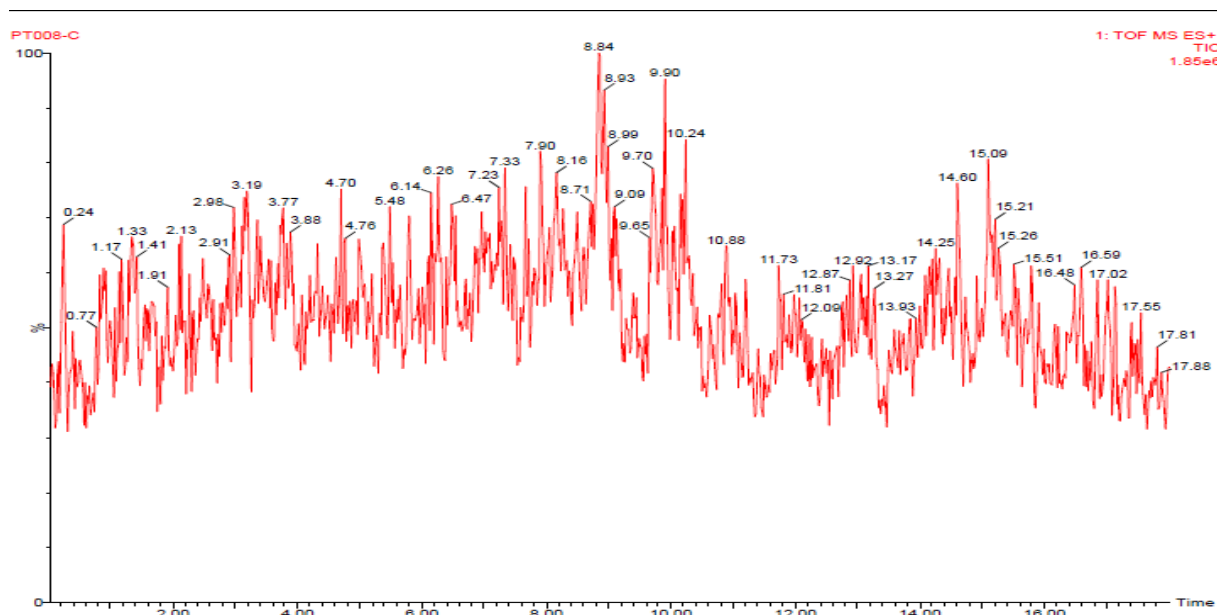


Figura S.13. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT008. Fracción: Carga

Muestra: **PT008**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **Si**

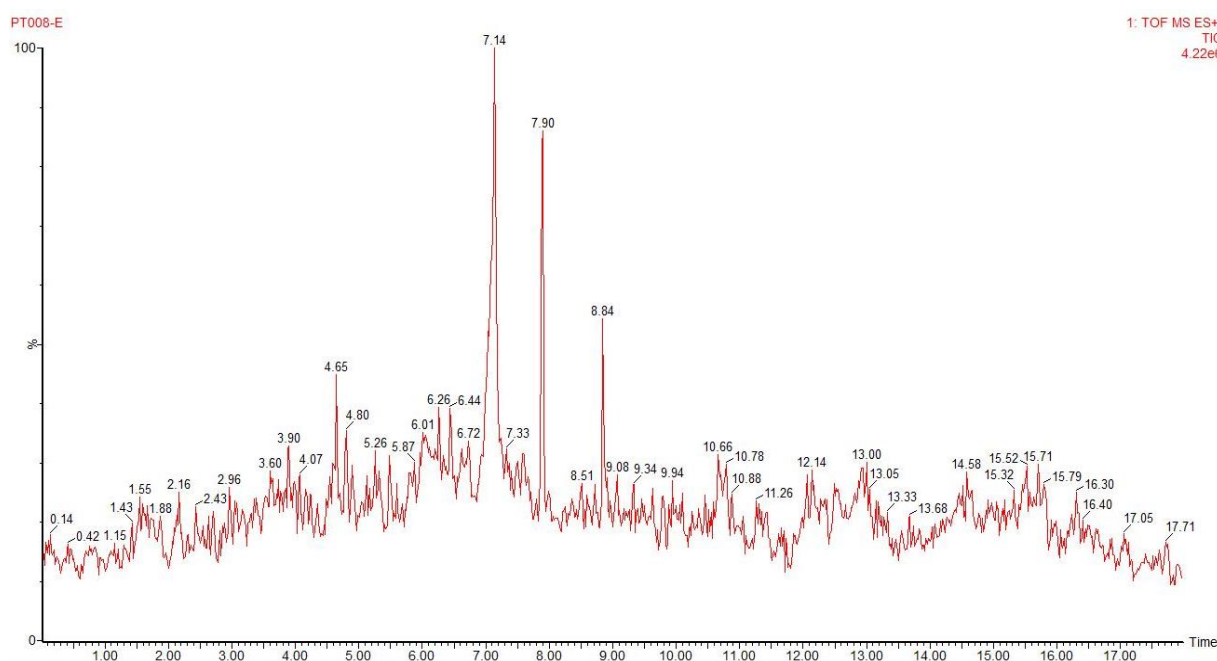


Figura S.14. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT008. Fracción: ELU-1.

Muestra: **PT009**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **Si**

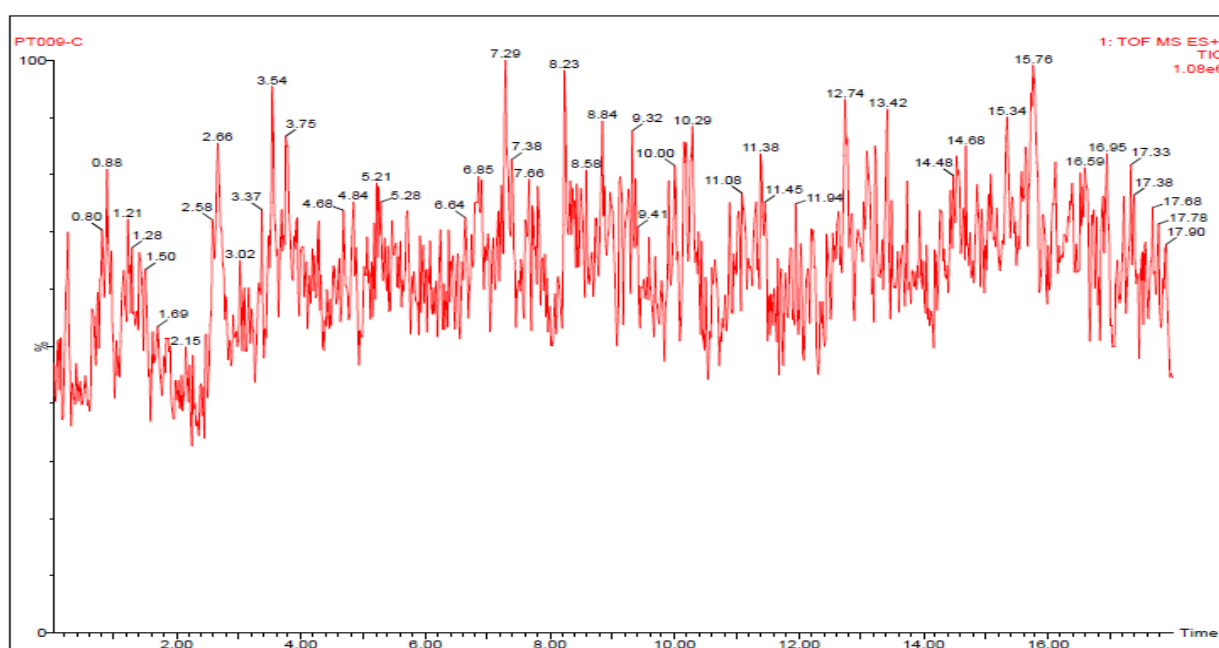


Figura S.15. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT009. Fracción: Carga

Muestra: **PT009**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **Si**

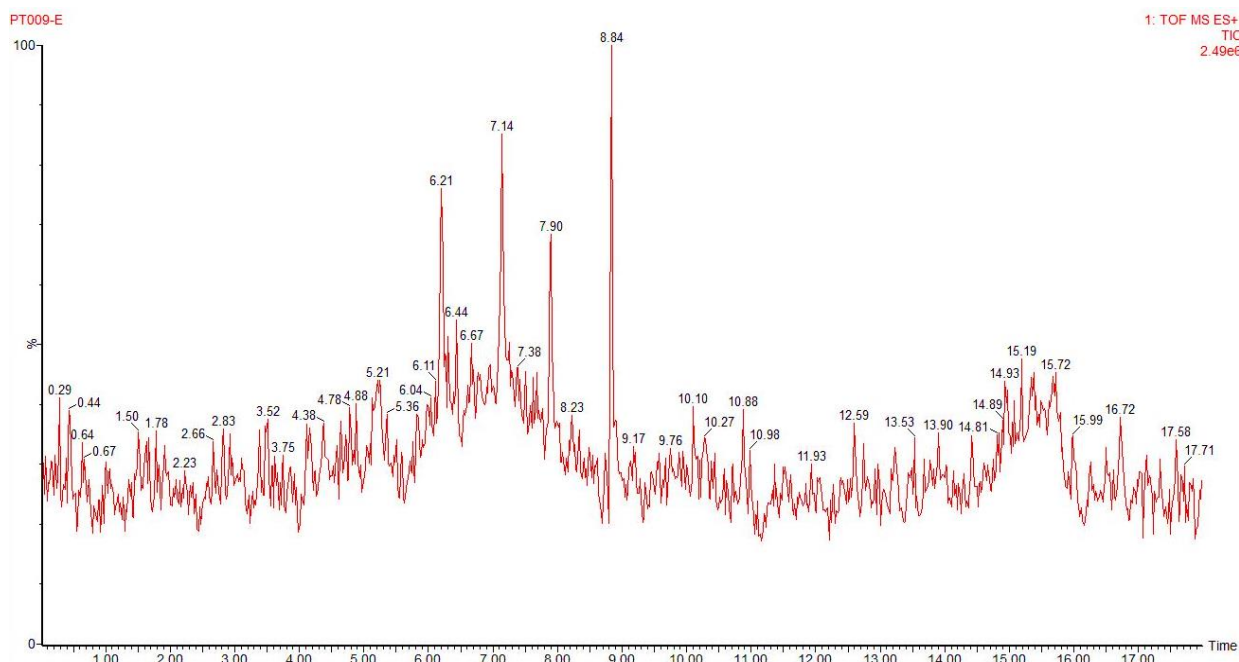


Figura S.16. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT009. Fracción: ELU-1.

Muestra: **PT0011**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **No**

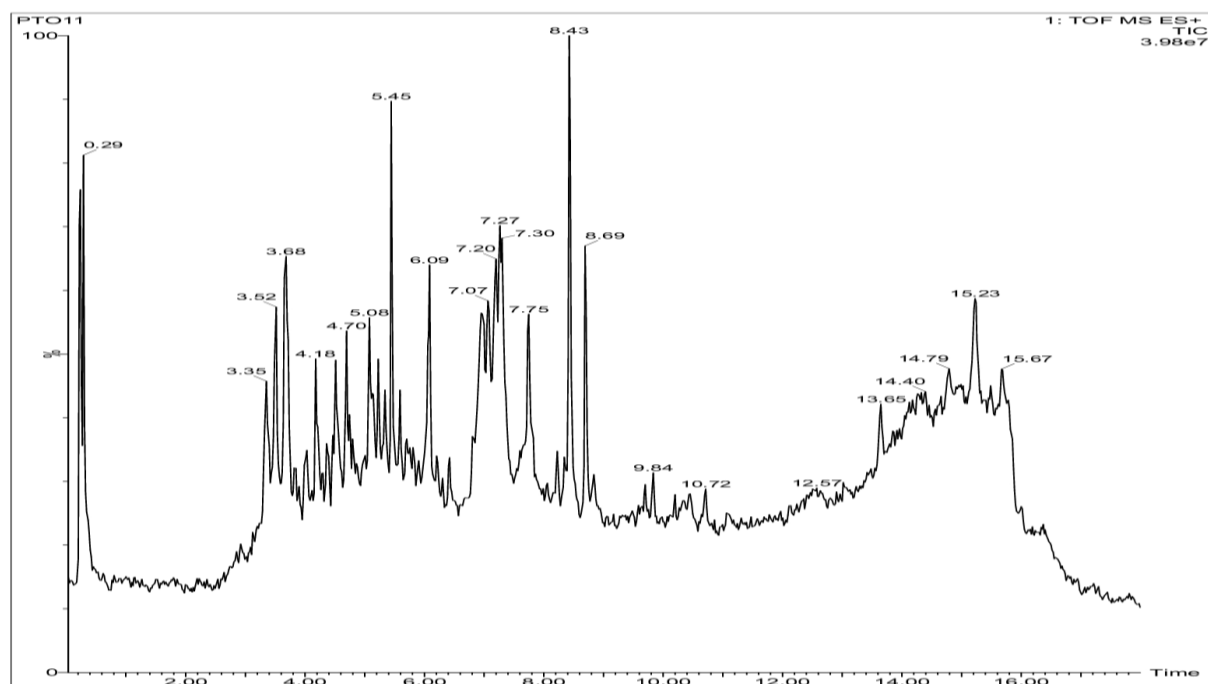


Figura S.17. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT011.

Muestra: **PT012**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **No**

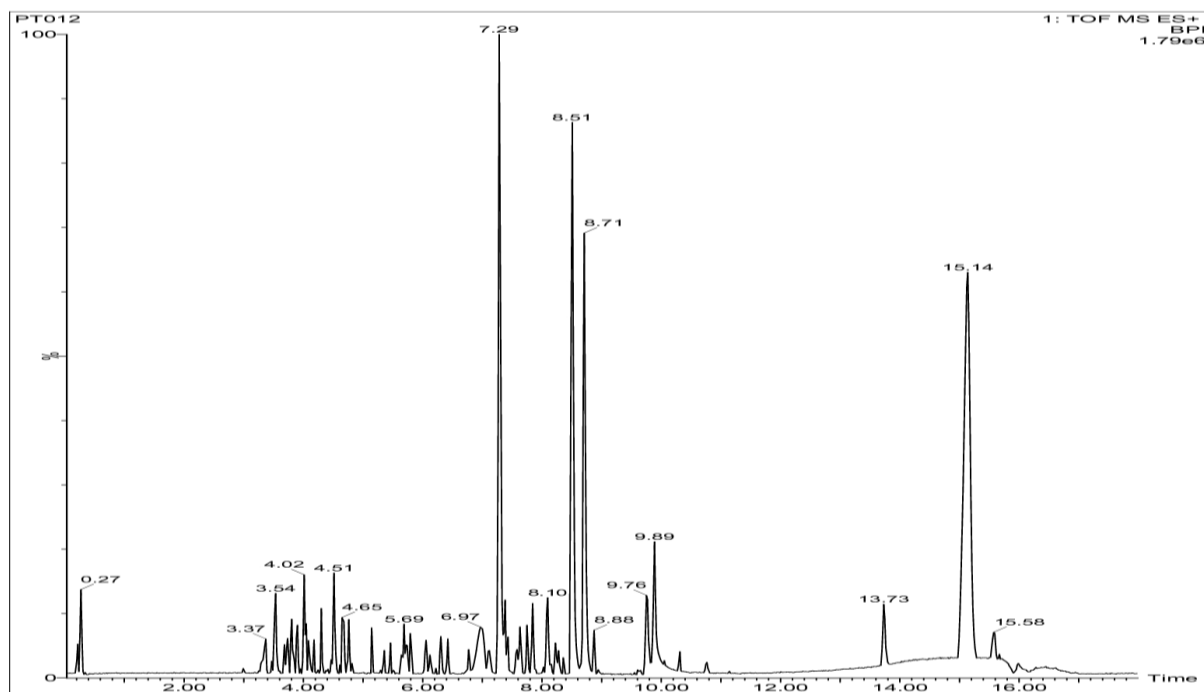


Figura S.18. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT012.

Muestra: **PT013**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **No**

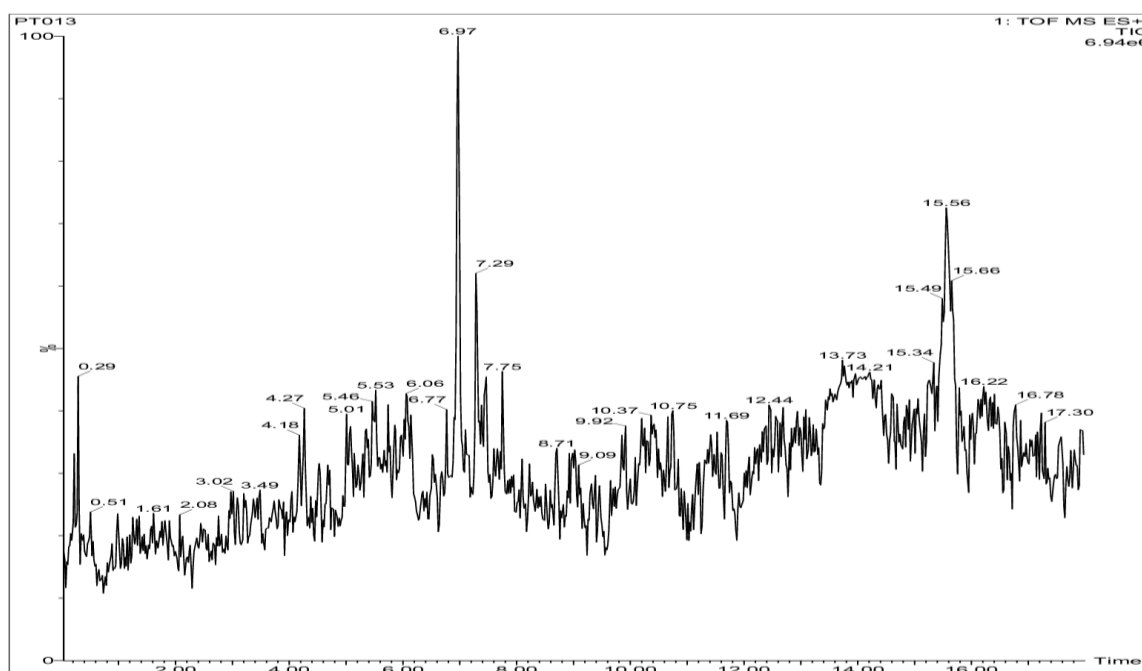


Figura S.19. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT013.

Muestra: **PT014**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **No**

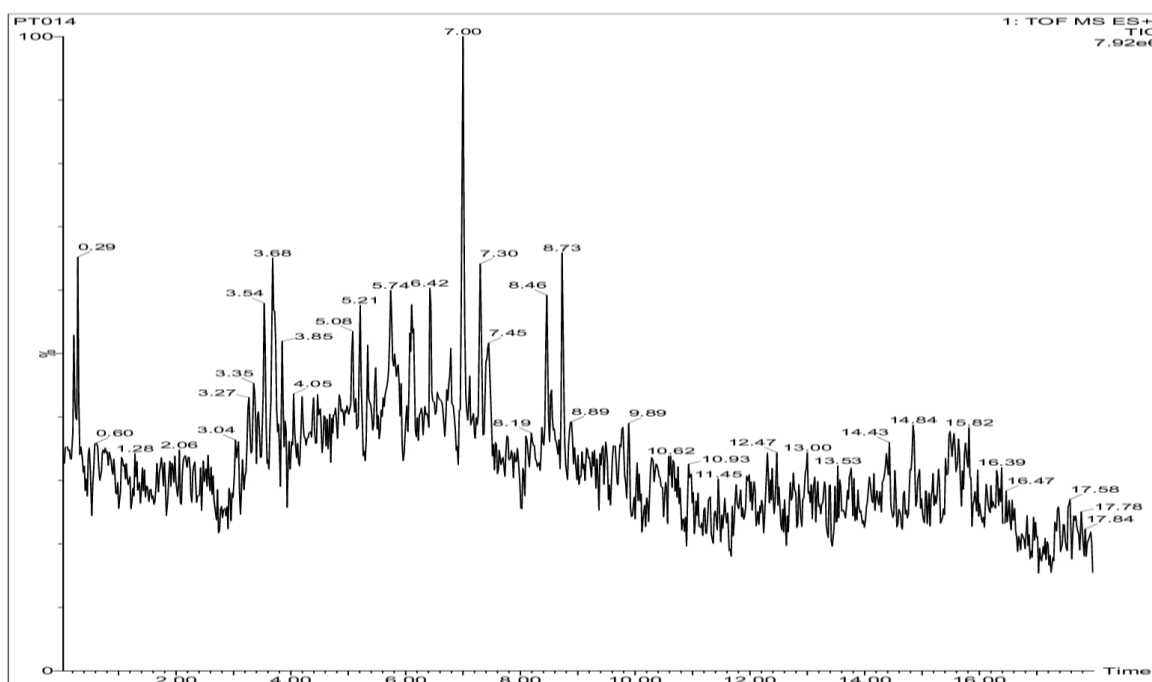


Figura S.20. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT014.

Muestra: **PT015**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **No**

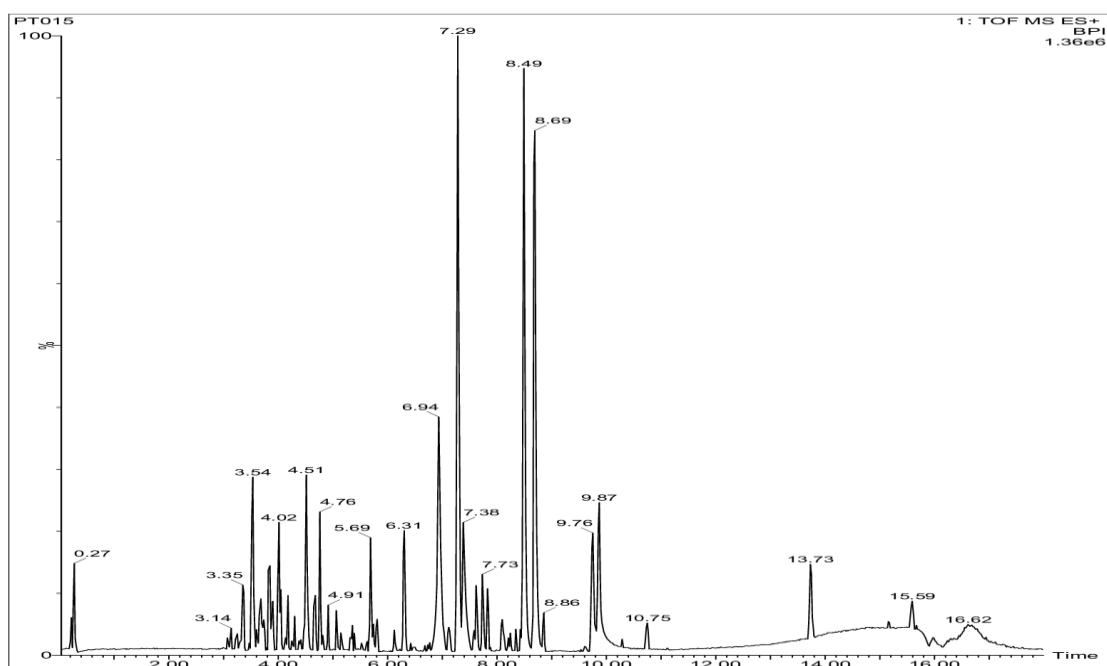


Figura S.21. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT015.

Muestra: **PT016**

Método de preservación: **Ninguno**

SPE: **No**

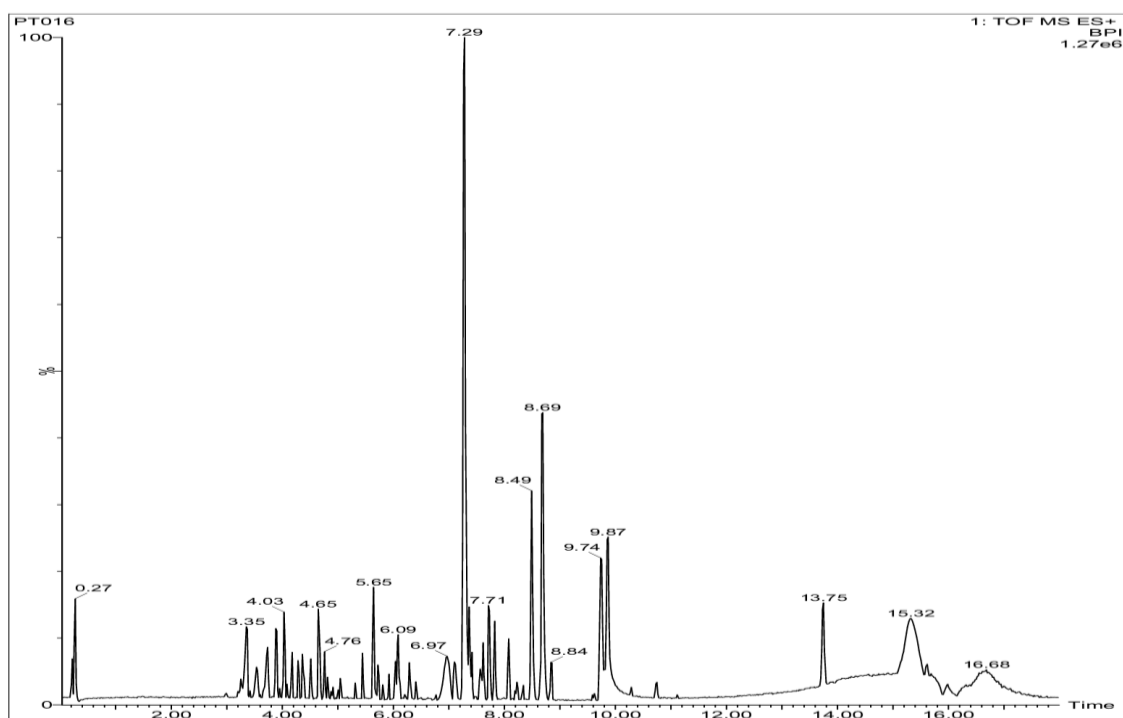


Figura S.22. Cromatograma UPLC-MS de la muestra PT016.

## ANEXO II

Masas (Da) monoisotópicas (en bruto) de las distintas muestras obtenidas del análisis de UPLC-MS.

PT002		PT003		PT004		PT005	
Carga	Elución	Carga	Elución	Carga	Elución	Carga	Elución
1838,6532	1447,503	3470,6255	1991,7904	1822,6659	1434,5308	1822,6548	2286,8432
2033,8596	1193,3508	1822,6566	2832,1544	1876,768	1472,4652	2070,6438	3093,3024
3216,3932	2109,7746	1991,7916	3091,3056	1891,854	2641,8234	3510,2065	3124,2956
3913,405	2540,1118	903,3946	3400,3348	1991,7876	2513,0516	2070,6399	3854,469
1707,6327	2592,04	3109,335	3854,474	903,3982	2541,0644	3554,2555	823,34
2633,0484	2111,7705		2713,0416	3123,243	4948,952	2685,0258	2713,0449
3051,1648	2540,1441		4837,8834	3141,342	4964,959	2583,9936	2812,21
3216,4335	1560,4958		7719,9857	1065,7044	4838,8992	3469,4875	3500,3796
4157,6982	1477,4874		2078,0056	2734,9842	4875,8478	3538,2425	4837,9866
1822,653	1634,5722		3612,4048	3109,369	4891,848	5369,223	2980,1037
2070,6483	4332,5405		3799,3484		7721,0322	5481,2751	3725,154
1876,7915	638,2632		4065,7395		1991,7549	5569,3155	4120,8515
1991,8005	1634,5734		4787,72		2078,0016	903,3946	4233,882
3123,3195	2247,8802		6531,7686		2115,9508	903,3948	4845,088
3176,2505	2295,8649		2111,7753		1609,5644	1897,7612	2111,7678
3870,4686	2004,7107		2540,1531		1682,649	2389,5525	2540,1498
903,3932	2420,2131		4888,0645		7551,9794	2808,8637	4888,1112
3125,3168	2620,2256		2767,3455		7568,0255	3141,31	2758,2177
1065,7236	3855,5464		3526,35		3799,388	3983,5968	1049,4171
1193,3554	1464,6252		2758,2198		6530,839	5370,2646	1560,5211
2832,1424	1577,7084		3785,4171		6602,7934	2734,9665	2671,1931
3854,496	3855,5016		2671,1895		4065,7595	2988,0027	3639,5316
4121,7378	927,5826		1449,9615		6618,744	3125,316	3873,5256
3109,33	1351,5328		2019,9198		1994,7393	1193,3594	7856,4241
1868,5929	1464,6309		2750,2044		2758,2075	3854,4725	1477,4932
3509,2935	1577,7123		4331,586		3334,311	3453,4998	2019,9219
1152,7542	1103,6318		3900,7794		1412,3134	3854,4654	4332,5395
1447,5114	1678,7589		1634,5706		4235,9285	4121,7108	1650,7894
3291,2055	2336,2479		2729,5188		1633,5934	3109,3172	3916,7664
3476,3128	2890,4372		4412,0025		3932,4608	1645,6602	4331,585
1223,7942	2955,2229		6511,036		3969,4088	2109,1182	3900,7788
2641,869	2890,4241		1578,0078		3985,4344	2774,2131	1634,577
3460,3016	2955,2541		3025,3495		2256,8682	4233,8524	2097,8394
3996,4488	1928,208		3231,5528		3831,6125	3612,3447	1874,508
823,394	2044,8554		2055,0668		1758,6026	2111,7759	2004,6916
2276,9232	3010,2759		2258,1657		8493,3121	2540,1423	2539,0236
1506,5368	3252,4088		2420,2197		1477,4874	3910,486	3871,556
2980,1224	1928,2089		1351,531		4332,539	4888,0572	2623,307
3612,378	2851,1661		1577,6948		4349,9015	2567,9829	3231,5948
2540,1597	2167,2321		1678,7691		4386,88	3855,494	3855,5408
2111,729	1338,8799		5557,177		1117,694	1672,6586	1672,6797
2540,1564	1981,1652		1838,163		3816,678	1577,6846	1351,5292
4888,1105	3174,3954		704,2384		3916,7705	1678,7661	1577,7132
1560,4992	1153,7482		2890,4504		2240,8701	2890,4124	1678,7418
1449,9364	1946,2773		2955,2295		2100,8373	2927,1633	2890,4464
1790,6684	1254,7968				2871,2012	2167,2399	2167,2294
2100,8133	1382,8671				1981,0752		1338,8638
3900,7516	1382,8518				2319,9234		1382,8542
1634,5726	3007,296				3900,7338		600,2888
2953,3512					2855,1992		511,5065



PT002		PT003		PT004		PT005	
Carga	Elución	Carga	Elución	Carga	Elución	Carga	Elución
2247,8847					4412,008		533,4885
2004,7053					1409,5894		539,5356
3393,6135					9925,4024		561,5165
2582,2452					975,3544		684,4339
3153,479					1028,2662		1346,8717
3598,533					1950,6688		684,4341
3855,5524					1688,4918		1346,8717
1577,7147					1634,5706		
1678,7613					1758,8058		
2890,442					1705,8864		
2167,2255					1727,8656		
1382,8516					2953,3745		
392,3008					2896,2968		
412,2693					4343,926		
535,1662					4412,992		
					1179,7718		
					2346,9486		
					2436,2154		
					3231,6004		
					6610,2204		
					3153,47		
					3302,2804		
					3332,2353		
					3856,5396		
					3893,4604		
					2473,1456		
					2420,199		
					2494,0215		
					1572,0051		
					1577,7162		
					1571,0124		
					1570,9808		
					1838,1651		
					3219,3366		
					3024,3132		
					1056,2812		
					2890,4452		
					1592,9624		
					3283,519		
					3324,5845		
					1445,0612		
					1453,551		
					2851,1796		
					3042,3129		
					2228,2116		
					4471,9866		
					3034,3293		
					4473,0255		
					4500,9135		
					2167,2315		
					3343,4936		
					1616,9475		
					3175,3952		

PT006		PT007		PT008		PT009	
Carga	Elución	Carga	Elución	Carga	Elución	Carga	Elución
1838,6532	903,3926	3216,3644	1991,7928	3216,3644	1868,5875	3471,558	1822,6593
2033,8596	1193,356	3216,4048	2684,9876	3216,4044	1755,4608	1838,6577	1991,7796
3216,3932	1868,5947	3216,4024	2747,0528	2040,8349	2996,1536	2033,8578	3092,266
3913,405	2634,6969	3216,4205	3216,389	2551,08	4980,8283	3216,452	3400,3608
1707,6327	3109,338	2411,3241	3216,4165	3216,386	2713,0296	2747,0736	3854,4696
2633,0484	3423,376	3216,418	903,3952	3216,374	4837,9494	4157,6545	903,3956
3051,1648	3854,4615	2701,046	3982,6285	2033,8436	3612,375	1822,6533	1193,359
3216,4335	2540,1546	4157,64	3084,3568	3216,438	3799,3865	2070,705	3092,276
4157,6982	3979,5	3216,4425	3870,456	3984,4225	2111,769	1991,7725	3854,428
1822,653	2980,12	3886,372	1879,4979	1838,6592	2540,145	1991,7856	1193,3586
2070,6483	3612,3687	2701,0168	3854,523	2033,8624	3854,4705	4774,4142	3854,4655
1876,7915	4888,1226	3216,443	4121,7756	3216,395	2758,2189	5570,25	1554,6512
1991,8005	1576,5081	3871,4765	3423,3745	2679,312	926,6394	4774,494	3109,2665
3123,3195	2021,6872	3216,4195	3854,4912	2747,062	2671,182	5570,325	3090,312
3176,2505	2111,8272	3870,4145	3091,312	3216,3952	3785,412	903,393	1846,7264
3870,4686	2540,1444	4175,675	3487,3655	3216,39	4686,3816	3141,305	2773,1055
903,3932	4888,0805	1033,527	2099,7177	2070,6504	5468,5404	1065,7278	4065,6735
3125,3168	2758,2501	1991,8035	3443,148	3216,402	7017,3012	3092,2516	5788,8942
1065,7236	4889,0715	2685,0625	4228,5208	1891,842	1425,592	3854,4265	6753,7122
1193,3554	2109,786	903,391	4614,9204	1033,5309	2256,8724	1603,6257	1576,5016
2832,1424	2758,2066	1677,6585	4711,842	1876,7536	3884,1024	2832,1148	2111,7705
3854,496	3574,362	903,394	7377,8832	1991,796	8123,3058	3854,4216	2540,1516
4121,7378	1560,5115	3982,599	3500,4055	4774,4988	8291,5567	4121,6892	1398,0926
3109,33	2130,312	3735,1045	1141,737	5569,242	4250,7415	3109,2936	2758,2192
1868,5929	2537,0952	3870,4405	3612,3892	903,3918	7431,5801	3091,2925	1560,5295
3509,2935	2671,1712	4137,7398	3799,383	1677,6606	8491,2352	1447,5176	2671,17
1152,7542	1477,4898	4905,168	6558,3354	5414,1906	9907,6803	2890,4104	4528,713
1447,5114	4331,5254	1065,7263	6734,8992	903,3934	4250,7162	684,4307	926,6378
3291,2055	2100,8184	3092,244	1805,7855	3141,3285	7278,8004	436,1953	2671,1835
3476,3128	2100,8184	3854,456	4234,849	3123,3145	1790,6919	533,4858	3873,5528
1223,7942	3900,7836	4137,6535	5789,748	1065,703	3916,7705	436,1949	6734,8734
2641,869	1634,5722	4905,1194	7856,394	2734,9632	4348,9335	539,5357	7280,7384
3460,3016	2247,8805	1661,6976	7857,441	3125,313	2100,8214	367,4286	1449,9642
3996,4488	2004,7104	3854,4912	2239,9536	3854,437	3900,792	436,1961	2204,8065
823,3394	2247,8832	2929,074	2717,3625	4137,656	1634,5788	609,186	4331,5035
2276,9232	783,3332	3030,1344	3775,3708	1603,6305	2346,9537	637,2144	3900,746
1506,5368	1179,7758	3108,199	6755,7679	2832,1376	4085,103	367,4279	1634,5712
2980,1224	2346,9501	3854,3925	7857,4468	4121,7036	4902,18	436,1956	2004,7047
3612,378	3231,5948	925,354	2767,3565	1935,2403	7416,3786	1150,2683	3231,582
2540,1597	3855,5484	4615,9764	6755,8197	3854,491	3231,5745	367,429	6511,1406
2111,729	2420,22	4711,8024	7856,3009	3108,316	7417,4214	436,1956	3855,5145
2540,1564	1351,53	4615,9626	2109,7875	3487,3555	2710,1856	684,4344	1351,5312
4888,1105	1577,7141	4711,8642	3574,38	823,3361	3302,2992		1838,1624
1560,4992	2482,3012	1141,7422	7857,3908	1447,5096	3368,2044		2955,2667
1449,9364	2955,1932	1522,3424	926,6336	4613,8638	4647,054		2890,4284
1790,6684	3024,3088	436,1945	2537,1177	524,29	7332,476		2927,1924
2100,8133	2890,428	1382,8492	2767,321	3881,4115	2494,0188		3283,4808
3900,7516	2955,2067	364,1392	5892,2214	4614,9222	1351,531		3266,4408
1634,5726	3024,3064	436,1985	7857,4384	4711,9206	1577,7135		1928,2008
2953,3512	4500,977	405,3321	7856,4318	1749,5919	3923,5108		2123,2281
2247,8847	2890,4448	436,1966	3683,9268	612,3415	8593,4303		3033,324
3854,4984	2955,2313	684,4332	3879,2925	2774,2074	11048,9722		3359,9428
4121,6976	2890,4262	436,1967	6875,1865	1577,7189	2890,4452		4501,005
3107,3275	1567,6932	511,505	7856,4465	2890,4408	3323,624		3339,5016
1447,512	3283,4736	684,4379		2890,444	3612,036		4500,9852

PT006		PT007		PT008		PT009	
Carga	Elución	Carga	Elución	Carga	Elución	Carga	Elución
823,3393	2851,1272	436,1965	7857,4368	382,2075	1928,2119		2167,2288
2579,8746	3339,5445	684,4325	1360,6002	436,1949	2123,2497		3174,3894
1767,825	2167,2288	778,1366	3012,644	436,1952	2653,2345		1740,7611
436,1965	1537,895	367,4285	7856,4234	684,4281	3033,37		3698,5812
436,1963	2167,2264	436,1961	2652,2152		1938,1293		1946,2725
683,2051	3339,548	684,4338	3873,5488		3339,5805		1382,85
436,1961	3174,3945	367,4286	6733,1556		2167,2351		558,1266
683,2114	3698,5965	436,1967	7280,6976		2167,211		684,4342
3698,5965	1382,8536	762,1728	7856,4054		3340,5364		436,1951
367,4282	1382,8544		4331,556		3174,3888		852,1641
436,1963	405,3323		5892,0786		1740,756		836,194
586,548	436,1952		7856,4108		1946,2752		852,1677
367,4285	684,4337		1438,4904		1990,2092		609,1831
436,1959	436,1949		3900,7704		1382,8512		836,1917
928,2208	684,4327		1426,7666		2167,2068		852,1646
367,4289	436,196		1705,8802		1382,835		
436,1969	684,4339		2638,2152		436,1962		
609,1846	436,1953		2783,2528		511,5048		
367,4276	938,5894		2896,3004		684,4297		
436,195	1076,2542		2004,7113		436,1966		
684,4325	1092,2281		5384,9615		684,4371		
	778,1479		5982,151		609,1861		
	1076,2546		3855,5352		749,4006		
	1092,2222		1351,5326		1398,7913		
	778,1448		1577,6982				
	1076,254		1678,7601				
	1092,226		3923,4964				
	778,1456		2810,1576				
	1076,2539		2890,434				
	1092,2229		2955,2133				
			3024,3016				
			2890,4548				
			2890,4396				
			3323,578				
			4154,471				
			1928,2113				
			3033,3366				
			2891,4924				
			4500,9354				
			2167,2068				
			1981,1628				
			1740,7494				
			1153,7508				
			1382,8496				
			1382,848				
			3033,4266				
			3291,5307				
			436,1963				
			1198,7668				
			1198,7621				
			609,1826				
			684,4345				

PT011	PT012	PT013	PT014	PT015	PT016
1707,6324	1991,7904	2747,014	1707,6342	1707,6168	1991,7856
1822,6533	3141,318	1033,5136	3123,3236	3123,303	2070,6306
1991,7832	3848,5235	2070,66	3309,0315	3216,3969	3216,441
3123,321	3471,6408	1876,7656	1822,6476	3314,3757	3314,3499
1707,6285	2033,882	1991,808	2925,9876	2033,8895	903,3984
2430,212	1822,6518	903,3978	2926,0014	1822,6539	1852,5846
2747,085	3972,3104	1852,5705	1033,5303	1033,5303	3854,443
3051,1696	1033,5178	3854,429	1991,808	1876,762	3400,3408
3141,2995	3554,246	1065,7275	903,3978	1991,78	4121,73
4157,6745	903,3954	2734,9542	4773,5664	2685,0432	1661,6522
1822,6638	3123,309	3400,348	5569,3062	4773,5664	3423,3755
2747,0472	1065,7278	2713,0491	903,3968	5569,2846	3854,4648
903,394	2734,9713	938,3498	4283,2992	1677,6657	480,2644
3123,318	3854,463	1692,6123	4383,9528	903,3751	714,4886
1193,3369	1193,355	2980,0996	903,3946	3141,3165	3109,2915
3107,3275	714,488	3612,3474	3141,3068	392,2141	524,2903
889,3814	3107,344	2285,2492	1852,581	2808,8589	2682,0231
1447,518	1868,5908	2556,1335	2808,8589	3107,319	4269,3468
612,3399	1755,4824	4065,7088	3124,2835	3854,4972	4980,8874
4837,9092	485,3826	1438,7943	3854,4375	1065,732	2068,6818
651,4117	842,5466	2111,7795	1193,3584	1661,6558	2513,0624
656,3661	913,583	2540,1642	714,4906	2704,0425	3177,1656
1733,8678	1060,6674	4888,12	3107,3255	3125,3625	3544,394
4837,9218	2513,0523	1425,579	1447,5124	1193,3584	3935,4076
1625,7898	2276,9307	798,5808	832,4698	714,4906	612,339
3612,3768	4837,9176	1011,455	2558,1968	1447,5124	2276,9499
4837,887	1733,6136	1409,5878	5742,3972	832,4804	2579,9049
3612,3867	2189,9244	2671,2081	568,3148	1971,6304	1989,7244
3780,5428	3612,3714	2758,1952	1056,3	2286,8512	656,3655
3895,6424	3799,4085	4528,7754	612,339	3291,2319	1733,861
4065,7385	2540,1501	6734,907	4837,9104	3476,3236	2980,1296
1718,8185	4221,9445	7857,3894	2687,2053	4082,5704	744,4172
2111,7711	2671,1916	1449,9609	3612,3704	3177,1875	2540,154
2540,1582	4235,9555	4250,7336	4065,732	3672,342	4888,1196
1633,591	926,6378	4331,5656	4103,6436	612,339	788,4387
2109,7941	984,6422	784,53	1605,771	1787,8578	975,355
2758,2279	4263,9565	1790,673	1983,6838	2556,1365	2758,2165
3574,4076	2410,0932	2100,8133	2540,1462	2713,0359	6581,658
4888,0955	2758,2027	1439,5448	3775,3268	3588,422	6734,0532
798,5798	4027,8515	3900,7635	810,4416	4837,9104	926,6374
926,6368	1477,4902	1634,5734	3526,332	2687,2053	2671,1919
1011,4546	2019,9258	2896,3028	4407,9855	3612,3704	4671,8748
1846,9686	2355,9309	2953,3448	2758,2186	4065,72	5450,5092
2109,7911	4331,5472	4342,9125	3785,4294	1296,5452	2019,9171
2537,1052	3900,7854	2004,7017	1633,6116	2540,1392	2165,7906
2767,3308	4412,0285	767,4926	2355,2584	810,444	2983,2305
3574,3692	1634,576	1179,774	3574,3616	3526,2501	4331,5304
4471,6588	1092,7446	3153,4995	926,6396	2758,2186	5892,3
4888,0908	2953,37	3286,2837	2671,1982	926,6376	1055,6794
2035,9113	4341,915	4210,6563	2954,367	2671,1952	2240,8677
4528,7394	3843,5108	3302,2952	984,6414	485,3654	4250,7114
4888,1295	1470,7718	3855,55	3683,8734	598,4465	3900,7818
1477,4932	2539,0389	2494,0134	1477,4896	697,534	4679,8884
1728,7838	1179,774	1838,1464	3916,776	4331,565	1634,578
2019,9046	2565,9885	2810,1687	4331,5345	1449,963	2729,5645
4331,5644	1572,6656	3024,2852	2100,8184	2204,7732	2004,7113

PT011	PT012	PT013	PT014	PT015	PT016
1020,952	3430,2399	2890,4524	3900,7704	3916,7605	2570,8515
1728,779	1250,8062	2851,17	1565,682	784,531	1144,597
2019,9171	2582,2746	3537,6174	1634,574	1477,487	1334,5386
4777,0248	3302,2968	4500,982	2247,8865	3850,704	3231,5892
3900,7818	3855,5427	1928,2095	4372,911	1464,6345	2055,07
1634,5738	1285,5088	3033,3354	745,3693	3974,9244	2420,214
3269,154	1577,7168	4472,1162	2346,9609	642,4023	2582,2755
1634,5692	3442,3314	1938,1242	639,1721	3900,7704	3855,5548
1874,519	1678,7682	4499,9922	4255,8896	4018,9196	1351,533
2132,9991	3628,4788	2167,233	6449,322	2539,0332	1577,7165
4371,8136	3839,6276	3174,405	1440,5658	2596,9106	1678,7691
745,3683	1160,4704	1740,7824	2851,148	1144,6042	3024,284
4255,8864	3210,3228	3555,5043	2258,1738	1334,5452	2482,2372
2927,1538	1838,1729	1153,7504	2566,2888	686,389	2955,1983
3231,5852	2810,1588	1946,2812	2672,1396	1470,7664	2482,294
4255,9092	3024,3176	1382,8482	3315,2367	2567,9895	2890,4432
2232,0606	2215,4619	609,183	3855,5508	3301,3456	1938,1287
3117,5388	2955,2256	683,201	2055,0752	1250,8158	2167,2351
4255,9044	1938,129		2420,2245	2908,5115	436,1978
2055,0744	2167,2333		2494,0254	4255,918	3174,3834
2420,2215	3174,4044		1464,636	2643,2136	1338,8548
1672,6788	1711,8198		1678,7637	3286,311	1740,7707
2018,8868	1740,7701		3024,308	4648,1064	1153,7502
2420,2004	1153,7484		2482,2924	2055,0752	1382,868
3070,5111	1382,8508		2810,1672	2420,2245	440,2994
3283,5774	3007,3059		2890,4283	3302,2899	757,2178
5600,4996	3084,3165		1645,199	1672,6546	778,1463
927,5854	609,184		3252,46	1351,5318	684,4367
1577,7174			3305,318	1577,715	
1693,6526			3537,666	927,5862	
2055,073			1938,1293	2890,4092	
2258,1783			516,3055	1135,476	
1678,7458			2167,2351	3024,308	
2955,2516			3339,546	1838,138	
3283,4872			1338,8604	3537,5967	
3266,4596			3174,4395	410,209	
2167,2354			3698,6312	2322,3156	
3339,564			1153,7494	3323,5692	
2983,3485			1382,8528	317,3039	
3339,5605			609,1846	4500,9435	
3555,5022			683,2021	1938,1272	
4500,9388			535,1669	3519,6162	
1338,8624				2167,2342	
3174,4017				436,1959	
3698,6145				1338,8638	
1382,8554				3174,405	
578,2935				1740,777	
684,1251				3698,6288	
725,158				1153,7514	
3007,3047				453,3309	
412,2694				1382,8516	
782,5715				609,184	
802,54				684,4354	
412,2687				535,1682	
782,5697					
802,5379					

PT011	PT012	PT013	PT014	PT015	PT016
662,4525					
1346,8708					
1193,8097					

## ANEXO III

Secuencias e identificación de los péptidos identificados a través de la aplicación ConoMass de Conoserver.

(PTMs: Modificaciones PosTraduccionales)

Peak mass	Peptide mass	Mass error	Peptide name	Peptide sequence	Peptide PTMs
823,3361	823,336	1E-04	CV8_134_O2	PFGTCVTC(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
1360,6002	1360,569	0,0312	CV8_151_T	CCPKKLWCCPW(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
1438,4904	1438,48	0,0104	CV8_151_T	CCPKKL(Btr)CCPW(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Trp>BTr (x1)
<b>1439,5448</b>	<b>1439,464</b>	<b>0,0808</b>	<b>CV8_151_T</b>	<b>CCPKKL(Btr)CCPW</b>	<b>Trp&gt;BTr (x1)</b>
<b>1447,5124</b>	<b>1447,498</b>	<b>0,0144</b>	<b>CV8_067_M</b>	<b>CCPRPCTIGCVGCC</b>	
<b>1477,4888</b>	<b>1477,583</b>	<b>0,0942</b>	<b>CV8_157_T</b>	<b>KQILCCNTOGAOC</b>	<b>Pro&gt;Hyp (x2)</b>
1560,4958	1560,488	0,0078	CV8_065_M	CCSRYCWQCIPCC	
1567,6932	1567,628	0,0652	CV8_167_T	KAVCCEVFPDCCV(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
<b>1572,6656</b>	<b>1572,604</b>	<b>0,0616</b>	<b>CV8_191_Cerm 03</b>	<b>RCPAGCSSCPNGGCVPA(Nh2)</b>	<b>[free end]&gt;amidation (x1)</b>
1576,5016	1576,483	0,0186	CV8_065_M	CCSRYCWQCIOCC	Pro>Hyp (x1)
1633,591	1633,578	0,013	CV8_066_M	CCQLPCNIGCVPCW(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
1634,5692	1634,562	0,0072	CV8_066_M	CCQLPCNIGCVPCW	
<b>1852,5766</b>	<b>1852,554</b>	<b>0,0226</b>	<b>CV8_071_M</b>	<b>GCCEVCTHICWNDGNCC</b>	
1868,5875	1868,549	0,0385	CV8_071_M	GCCE(hVa)CTHICWNDGNCC	Val>hVA (x1)
1897,7612	1897,842	0,0808	CV8_156_T	KSPECCLSRHPCCQTLV(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
<b>1989,7244</b>	<b>1989,816</b>	<b>0,0916</b>	<b>CV8_156_T</b>	<b>KSO(Gla)CCLSRHOCQTL(hVa)(Nh2)</b>	<b>[free end]&gt;amidation (x1); Pro&gt;Hyp (x2);Glu&gt;Gla (x1); Val&gt;hVA (x1)</b>
1991,77	1991,739	0,031	CV8_003_A	DGCCYDPRCAGNHPHLCH(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
2021,6872	2021,705	0,0178	CV8_064_M	CCSQDCSVCIPCCPPMNNI(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
2055,0668	2055,068	0,0012	CV8_135_O2	GNAMSLKILATICPIPSNC(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
2070,6399	2070,623	0,0169	CV8_069_M	TCCDPCTHPCYNSYQCCH	
2070,6399	2070,623	0,0169	CV8_070_M	TCCDPCTHPCYNSYQCCH	
2111,729	2111,744	0,015	CV8_078_M	GCCTGQGCWNPICDCKTQ	
<b>2189,9244</b>	<b>2189,899</b>	<b>0,0254</b>	<b>CV8_189_Cerm 03</b>	<b>GVPCVGDCEKCPLTNCKDQ</b>	
2204,8065	2204,821	0,0145	CV8_159_T	NKHEPGWIDCSSMQDDCEN	
<b>2240,8677</b>	<b>2240,904</b>	<b>0,0363</b>	<b>CV8_002_A</b>	<b>GGCCSNOACKGNNOHRCRDIO(Nh2)</b>	<b>[free end]&gt;amidation (x1); Pro&gt;Hyp (x3)</b>
2247,8802	2247,826	0,0542	CV8_159_T	NKH(Gla)PGWIDCSSMQDDCEN(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Glu>Gla (x1)

Peak mass	Peptide mass	Mass error	Peptide name	Peptide sequence	Peptide PTMs
2389,5525	2389,525	0,0275	CV8_073_M	RCCS(Btr)YNC(Btr)(Gla)DCVCCMPP(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Trp>BTr (x2);Glu>Gla (x1)
2539,0236	2538,976	0,0476	CV8_175_U	QNDCPFCKVRCCPPGYCQPSGCAA(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
2539,0236	2538,976	0,0476	CV8_176_U	QNDCPFCKVRCCPPGYCQPSGCAA(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
2540,1118	2540,042	0,0698	CV8_192_Cerm 03	QIETRNLCOHCSGDGCHEDRTCI(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x1)
<b>2567,9895</b>	<b>2568,035</b>	<b>0,0455</b>	<b>CV8_192_Cerm 03</b>	<b>QI(Gla)TRNLCPHCSDGCHEDRTCI(Nh2)</b>	<b>[free end]&gt;amidation (x1); Glu&gt;Gla (x1)</b>
2579,8746	2579,887	0,0124	CV8_143_P	GSCGGTCT(hVa)SSDCPSTCDTCLAALCSE	Val>hVA (x1)
2583,9936	2584,031	0,0374	CV8_192_Cerm 03	QI(Gla)TRNLCOHCSGDGCHEDRTCI(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x1)
2713,0296	2713,029	0,0006	CV8_098_O1	CLGSGKRCWLDSSCCSFCTNNVCF	
2747,0184	2747,02	0,0016	CV8_001_A	GSW(Gla)(Gla)CCADOPCRQSNKDHCI RN	Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x2)
<b>2808,8589</b>	<b>2808,838</b>	<b>0,0209</b>	<b>CV8_144_P</b>	<b>GSCGGGCTSSSQCDSC(Gla)CWDAQCSEGP</b>	<b>Glu&gt;Gla (x1)</b>
2851,1272	2851,112	0,0152	CV8_101_O1	CROGG(hVa)ACGFOKOGOYCCSGWCIFVCA	Pro>Hyp (x4);Val>hVA (x1)
<b>2851,148</b>	<b>2851,112</b>	<b>0,036</b>	<b>CV8_101_O1</b>	<b>CROGG(hVa)ACGFOKOGOYCCSGWCIFVCA</b>	<b>Pro&gt;Hyp (x4);Val&gt;hVA (x1)</b>
2896,3004	2896,272	0,0284	CV8_168_T	FWKEVADGICCPMINKCCINKVEEE	
<b>2925,9876</b>	<b>2925,978</b>	<b>0,0096</b>	<b>CV8_221_Rimp 05</b>	<b>SCTFCOR(Gla)OCCHGDHCVMNOPFCGN</b>	<b>Pro&gt;Hyp (x3);Glu&gt;Gla (x1)</b>
2927,1538	2927,059	0,0948	CV8_195_Cerm 04	SNCNPSCLSGQFCNYDTC(Gla)PMFNSDL(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Glu>Gla (x1)
2929,074	2929,023	0,051	CV8_101_O1	CROGG(hVa)ACGFOKOGOYCCSG(Btr)CIFVCA	Trp>BTr (x1);Pro>Hyp (x4); Val>hVA (x1)
<b>2955,2166</b>	<b>2955,207</b>	<b>0,0096</b>	<b>CV8_102_O1</b>	<b>DNCIHGGKFCGLPQYGPICCSGFCVGACL</b>	
<b>2955,2166</b>	<b>2955,207</b>	<b>0,0096</b>	<b>CV8_103_O1</b>	<b>DNCIHGGKFCGLPQYGPICCSGFCVGACL</b>	
2980,1037	2980,197	0,0933	CV8_059_J	VOAEPVMEIICPTMCAMGVGEPYCNC PD	Pro>Hyp (x1)
<b>2983,2305</b>	<b>2983,266</b>	<b>0,0355</b>	<b>CV8_168_T</b>	<b>FWK(Gla)VADGICCPMINKCCINKV(Gla)EE(Nh2)</b>	<b>[free end]&gt;amidation (x1); Glu&gt;Gla (x2)</b>
2988,0027	2987,997	0,0057	CV8_099_O1	DCLO(hVa)GASCNLDDNKCCNYCLVF(Btr)CS	Trp>BTr (x1);Pro>Hyp (x1); Val>hVA (x1)
2996,1536	2996,191	0,0374	CV8_059_J	(hVa)PAEP(hVa)MEIICPTMCAMGVGEPYCNC PD	Val>hVA (x2)
3007,296	3007,207	0,089	CV8_059_J	VPA(Gla)PVM EIICPTMCAMGVGEPYCNC PD(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Glu>Gla (x1)
3024,3016	3024,31	0,0084	CV8_109_O1	QCGADGQFCFLPGLGLNCCSGLCLIVCVPT	
3033,324	3033,319	0,005	CV8_164_T	GDLNDIIDAGADIAKQICCCQITSKCCPDD	
3051,1002	3051,196	0,0958	CV8_059_J	VPA(Gla)PVM(Gla)IICPTMCAMGVGEPYCNC PD(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Glu>Gla (x2)
<b>3084,3165</b>	<b>3084,279</b>	<b>0,0375</b>	<b>CV8_104_O1</b>	<b>CFQTGEFCIPPITGSVFCCNNVCFVCL</b>	
<b>3084,3165</b>	<b>3084,279</b>	<b>0,0375</b>	<b>CV8_105_O1</b>	<b>CFQTGEFCIPPITGSVFCCNNVCFVCL</b>	



Peak mass	Peptide mass	Mass error	Peptide name	Peptide sequence	Peptide PTMs
3091,2925	3091,239	0,0535	CV8_096_O1	CKDOSTOCIRDSACCSGVCDIQHTGPSACL(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x2)
3092,244	3092,223	0,021	CV8_096_O1	CKDOSTOCIRDSACCSGVCDIQHTGPSACL	Pro>Hyp (x2)
3093,3024	3093,293	0,0094	CV8_116_O1	NCDAOGHOCGGTVIHRHCCSQRCVLFRC(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x2)
3107,3275	3107,39	0,0625	CV8_162_T	(Gla)ILNIIDA(hVa)SD(hVa)AKQICCCQITSKCCPDD(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Glu>Gla (x1);Val>hVA (x2)
3108,199	3108,217	0,018	CV8_096_O1	CKDOSTOCIRDSACCSG(hVa)CDIQHTGPSACL	Pro>Hyp (x2);Val>hVA (x1)
<b>3109,2915</b>	<b>3109,287</b>	<b>0,0045</b>	<b>CV8_116_O1</b>	<b>NCDAOGHOCGGT(hVa)IHRHCCSQRCVLFRC(Nh2)</b>	<b>[free end]&gt;amidation (x1); Pro&gt;Hyp (x2);Val&gt;hVA (x1)</b>
3123,3145	3123,385	0,0705	CV8_162_T	(Gla)ILNIIDA(hVa)SD(hVa)AKQICCCQITSKCCODD(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x1); Val>hVA (x2)
3124,2956	3124,297	0,0014	CV8_095_O1	DCSGSGYGCKNROCCDGLTCRGPRQGPICL(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x1)
3141,2995	3141,276	0,0235	CV8_095_O1	DCSGSGYGCKNROCCDGLTCRGORQGPICL	Pro>Hyp (x2)
<b>3174,3937</b>	<b>3174,383</b>	<b>0,0107</b>	<b>CV8_107_O1</b>	<b>SCLAEGDFCGFLVVKYFKCCEGVCLFVCV</b>	
3176,2505	3176,252	0,0015	CV8_104_O1	CFQTG(Gla)FCIOPITGS(hVa)FCCNN(hVa)CFFVCL	Pro>Hyp (x1); Glu>Gla (x1); Val>hVA (x2)
3176,2505	3176,252	0,0015	CV8_105_O1	CFQTG(Gla)FCIPPITGS(hVa)FCCNN(hVa)CFF(hVa)CL	Glu>Gla (x1);Val>hVA (x3)
<b>3177,1656</b>	<b>3177,182</b>	<b>0,0164</b>	<b>CV8_110_O1</b>	<b>RQCKAAG(Gla)LCSHG(Btr)NCCTGFCL(hVa)FCVO V(Nh2)</b>	<b>[free end]&gt;amidation (x1); Trp&gt;BTr (x1);Pro&gt;Hyp (x1); Glu&gt;Gla (x1);Val&gt;hVA (x1)</b>
3266,4408	3266,355	0,0858	CV8_107_O1	SCLA(Gla)GDFCGFL(hVa)(hVa)KYFKCCEG(hVa)CLFVCV	Glu>Gla (x1);Val>hVA (x3)
<b>3286,2837</b>	<b>3286,303</b>	<b>0,0193</b>	<b>CV8_058_J</b>	<b>(hVa)OOEHILEILCOSMCHEGA(hVa)DOFCNNCOD</b>	<b>Pro&gt;Hyp (x5);Val&gt;hVA (x2)</b>
<b>3301,3456</b>	<b>3301,371</b>	<b>0,0254</b>	<b>CV8_108_O1</b>	<b>ACL(Gla)QG(Gla)FCGI(hVa)FFGLFACCSKVCLFPACV</b>	<b>Glu&gt;Gla (x2);Val&gt;hVA (x1)</b>
<b>3305,318</b>	<b>3305,321</b>	<b>0,003</b>	<b>CV8_058_J</b>	<b>VPP(Gla)HIL(Gla)ILCPSMCH(Gla)GAVDPFCNNCP D(Nh2)</b>	<b>[free end]&gt;amidation (x1); Glu&gt;Gla (x3)</b>
<b>3314,3499</b>	<b>3314,298</b>	<b>0,0519</b>	<b>CV8_058_J</b>	<b>(hVa)OO(Gla)HILEILCOSMCHEGAVDOFCNNCOD</b>	<b>Pro&gt;Hyp (x5);Glu&gt;Gla (x1); Val&gt;hVA (x1)</b>
3359,9428	3360,002	0,0592	CV8_181_V	STCGTC(Gla)G(Gla)(Gla)CCGKCSCO(Btr)KGKOCTCIE W(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Trp>BTr (x1);Pro>Hyp (x2); Glu>Gla (x3)
3367,0194	3367,007	0,0124	CV8_229_Rmil 02	DCQSGCVGCHNOAGCCCG(Gla)QVCVDDNHC(Gla)OSS	Pro>Hyp (x2);Glu>Gla (x2)
3368,2044	3368,177	0,0274	CV8_046_I2	CIL(Gla)GTYCTSHNHCCEHVCCFGTCANOCGNV(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x1)
3400,3348	3400,311	0,0238	CV8_047_I2	CKPNKTYCSNSYECCTGVCCYGICANLCRNP(Nh2)	[free end]>amidation (x1)

Peak mass	Peptide mass	Mass error	Peptide name	Peptide sequence	Peptide PTMs
3423,3755	3423,408	0,0325	CV8_165_T	GDLNDIIDAGADIAKQICCCQITT(Gla)CCVV D(Gla)(Gla)(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Glu>Gla (x3)
3442,3314	3442,342	0,0106	CV8_087_O1	CDAOGAOCRKYDNECCDACMLQHPHPIC(hVa)(hVa)	Pro>Hyp (x2);Val>hVA (x2)
3443,148	3443,215	0,067	CV8_219_Rimp 02	QLCESRSCODHCGPDCRCDDANNYCD(hVa)SSNNN(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x1);Val>hVA (x1)
3460,3016	3460,255	0,0466	CV8_113_O1	(hVa)HEEC(hVa)KFGSMCGADMDTKCCYRCEDGMCV S(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Val>hVA (x2)
3476,3128	3476,291	0,0218	CV8_047_I2	CKONKTYCSNSY(Gla)CCTGVCCYGICANLCRNO(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x2);Glu>Gla (x1)
3494,231	3494,231	0	CV8_185_Y	CAGTG(Gla)SCGTDGDLQCCGMQKC(hVa)KNRCCPTT NGC	Glu>Gla (x1);Val>hVA (x1)
3509,2935	3509,338	0,0445	CV8_187_Cerm 03	ASCOSDC(Gla)TLCL(hVa)DN(hVa)C(Gla)ODONTRQEFQH P(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x3);Glu>Gla (x2); Val>hVA (x2)
3510,2065	3510,226	0,0195	CV8_185_Y	CAGTG(Gla)SCGTDGDLQCCGMQKC(hVa)KNRCCOTTNG C	Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x1); Val>hVA (x1)
3526,35	3526,357	0,007	CV8_084_O1	CDOOGTTGCNRLNECCNACMIRENQON(hVa)C A(hVa)(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x3);Val>hVA (x2)
3537,6094	3537,597	0,0124	CV8_137_O3	(hVa)VTEACYEDCKKQNKKCCGIRNGRHICTGGC I(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Val>hVA (x1)
3538,2425	3538,316	0,0735	CV8_187_Cerm 03	ASCOSDC(Gla)TLCL(hVa)DN(hVa)C(Gla)ODPNTRQ(Gla)F QHP	Pro>Hyp (x2);Glu>Gla (x3); Val>hVA (x2)
3544,394	3544,385	0,009	CV8_090_O1	CRKLSEGCSAYGPCCSGLQCCTNHGKGRCGSQCSA(N h2)	[free end]>amidation (x1)
3554,2485	3554,311	0,0625	CV8_187_Cerm 03	ASCOSDC(Gla)TLCL(hVa)DN(hVa)C(Gla)ODONTRQ(Gla)F QHP	Pro>Hyp (x3);Glu>Gla (x3); Val>hVA (x2)
3555,5022	3555,49	0,0122	CV8_111_O1	DCLADKEYCGILPFSNSGACCNHLCIFVCVPMP	
3574,362	3574,364	0,002	CV8_141_O3	ACSAPSDCPAGQICCPNRLDGR(Gla)GFCTD(Gla)CVLY	Glu>Gla (x2)
3588,422	3588,374	0,048	CV8_090_O1	CRKLS(Gla)GCSAYGPCCSGLQCCTNHGKGRCGSQCS A(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Glu>Gla (x1)
3598,533	3598,565	0,032	CV8_137_O3	(hVa)(hVa)T(Gla)ACYEDCKKQNKKCCGIRNGRHICTGGCI	Glu>Gla (x1);Val>hVA (x2)
3628,4788	3628,51	0,0312	CV8_080_M	SSCGHLGEFCCI(hVa)OKRAYCHEWLTCND(hVa)AK C(hVa)	Pro>Hyp (x1);Val>hVA (x3)
3639,5316	3639,526	0,0056	CV8_080_M	SSCGHLG(Gla)FCCI(hVa)OKRAYCHEWLTCNDVAKC V(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x1); Val>hVA (x1)
3672,342	3672,312	0,03	CV8_228_Rmil 02	DCQSGCVGCHNPAGCCCG(Gla)QVCVDDNHCEPSSRL I(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Glu>Gla (x1)

Peak mass	Peptide mass	Mass error	Peptide name	Peptide sequence	Peptide PTMs
3775,3268	3775,283	0,0438	CV8_131_O2	(Gla)DEC(hVa)GWSGYCGOWNNOCCSWYTCDYYCK F(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x3);Glu>Gla (x1); Val>hVA (x1)
3785,412	3785,343	0,069	CV8_129_O2	WR(Gla)LDGCTWTGOC(Gla)(hVa)DATCCSDSC(Gla)EKFC GLW(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x3); Val>hVA (x1)
3799,4085	3799,413	0,0045	CV8_226_Rmil 01	P(Gla)CYKCFPNDDGIC(Gla)GTCKTSETCKGSIRGCG CL	Glu>Gla (x2)
3799,4085	3799,413	0,0045	CV8_227_Rmil 01	P(Gla)CYKCFPNDDGIC(Gla)GTCKTSETCKGSIRGCG CL	Glu>Gla (x2)
3839,6276	3839,549	0,0786	CV8_138_O3	VVT(Gla)ACY(Gla)DCKKQNNYCYGRLFGTPVCG(Gla) EFF	Glu>Gla (x3)
3843,5108	3843,544	0,0332	CV8_138_O3	(hVa)(hVa)T(Gla)ACY(Gla)DCKKQNNYCYGRLFGT P(hVa)CGEEFF	Glu>Gla (x2);Val>hVA (x3)
3854,4583	3854,531	0,0727	CV8_055_I3	AWRGCRSAGQTCSNYPGCCSLCCFSGVCVMTIMPC I(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
3855,5476	3855,545	0,0026	CV8_138_O3	VVT(Gla)ACY(Gla)DCKKQNNYCYGRLFGTOVCG(Gla) EFF	Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x3)
3871,4765	3871,51	0,0335	CV8_055_I3	AWRGCRSAGQTCSNYOGCCSLCCFSGVCVMTIMPCI	Pro>Hyp (x1)
3873,5256	3873,505	0,0206	CV8_207_Cerm 10	V(Gla)(Gla)AC(Gla)GTSRSCRKODRTACCKNGHCRDNA CYI	Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x3)
3884,1024	3884,103	0,0006	CV8_131_O2	(Gla)DEC(hVa)G(Btr)SGYCGP(Btr)NNPPCCSWYTCDYYC KF	Trp>BTr (x2);Glu>Gla (x1); Val>hVA (x1)
3900,746	3900,718	0,028	CV8_037_H	DLDTLVTVIGTCGGDPCPFGCCRTFKGERKCRELDC	
3910,486	3910,444	0,042	CV8_122_O2	DA(Gla)KWWEGETDWLGSCISOAECCTGVCDAYCAAW (Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x1)
3916,7605	3916,713	0,0475	CV8_037_H	DLDTLVTVIGTCGGDOCPFGCCRTFKGERKCRELDC	Pro>Hyp (x1)
3935,4076	3935,431	0,0234	CV8_052_I3	CQDKYESCWNSQCCGQLCCTGPSYCDDSIGRCK F(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
3972,3104	3972,359	0,0486	CV8_122_O2	DA(Gla)K(Btr)WEGETDWLGSCISPAECCTGVCDAYC AAW(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Trp>BTr (x1);Glu>Gla (x1)
3979,5	3979,443	0,057	CV8_146_P	NOPPLPPND(Gla)CPRYCETDRDCGYNCDCNSNRCEH	Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x1)
3982,599	3982,573	0,026	CV8_036_H	DLDOLGTHQGKCGD(hVa)TCKVGCC(Gla)TIDG(Gla)ERC KELDC	Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x2); Val>hVA (x1)
3984,4225	3984,44	0,0175	CV8_204_Cerm 10	ADSEEFPCAGTFADCRDQPNGT(hVa)CCDTGACYG E(hVa)CYY(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Val>hVA (x2)
3996,4488	3996,44	0,0088	CV8_204_Cerm 10	ADS(Gla)EFPCAGTFADCRDQPNGTVCCDTGACYGEVCY Y(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Glu>Gla (x1)

Peak mass	Peptide mass	Mass error	Peptide name	Peptide sequence	Peptide PTMs
<b>4082,5704</b>	<b>4082,532</b>	<b>0,0384</b>	<b>CV8_120_O2</b>	<b>QCKOKDH(hVa)CEEKDECCONLECKCYTOTDCQSGYKC</b>	<b>Pro&gt;Hyp (x3);Val&gt;hVA (x1)</b>
4085,103	4085,176	0,073	CV8_122_O2	DAEK(Btr)(Btr)EGECTD(Btr)LGSCISPAECCTGVCDAYCAAW	Trp>BTr (x3)
4121,6892	4121,688	0,0012	CV8_051_I2	RTSCSFSQCPCKTPDICCLYRSGGTCGNPGDCLAPFLQC(Nh2)	[free end]>amidation (x1)
4137,6535	4137,661	0,0075	CV8_239_Cver 03	NDFCKRPFSTGDYCTGTQTCCIPPGSLTGVCCK(Gla)PDECQ	Glu>Gla (x1)
4154,471	4154,515	0,044	CV8_120_O2	QCKOKDH(hVa)C(Gla)(Gla)KDECCONLECKCYTPDCQSGYKC	Pro>Hyp (x2);Glu>Gla (x2);Val>hVA (x1)
4157,64	4157,652	0,012	CV8_239_Cver 03	NDFCKROFSTGDYCTGTQTCCIOOGLSLTG(hVa)CKEPDECQ	Pro>Hyp (x3);Val>hVA (x1)
4175,641	4175,63	0,011	CV8_133_O2	CKENGETCESDSQCCDDLRTCLQPAACSDKLNGKCRAS	
4176,69	4176,591	0,099	CV8_205_Cerm 10	SMEEVTEACEGTSTDCRGQONGTPCCRNAGECRGYVCYY(Nh2)	[free end]>amidation (x1);Pro>Hyp (x1)
<b>4210,6563</b>	<b>4210,57</b>	<b>0,0863</b>	<b>CV8_088_O1</b>	<b>CADEHDOCE(hVa)GNONCCKGTCYGDENEAVCVNVQYAYAVS</b>	<b>Pro&gt;Hyp (x2);Val&gt;hVA (x1)</b>
4228,5208	4228,479	0,0418	CV8_173_U	(Gla)TDAMDIOCOEGCKHCSGSH(hVa)ACGCCGNAICDDDG(hVa)CRS(hVa)G(Nh2)	[free end]>amidation (x1);Pro>Hyp (x2);Glu>Gla (x1);Val>hVA (x3)
4331,5035	4331,508	0,0045	CV8_045_I1	DWGPCSHIGQGCNHFYDCCGDMCCYHHMCVVTFGACGHF	
4371,8136	4371,77	0,0436	CV8_174_U	AOAEKSEVKSDCSWDCVTCGTGPRCGCCGNVICHTTGLCQFV	Pro>Hyp (x1)
<b>4383,9528</b>	<b>4383,88</b>	<b>0,0728</b>	<b>CV8_082_N</b>	<b>CISGKTCGSGEHEVCCKHTDCTCHLLKSRPWWRLVCVCD</b>	
<b>4407,9855</b>	<b>4407,886</b>	<b>0,0995</b>	<b>CV8_118_O1</b>	<b>SADEMGNSEIKOLINIKNCSPAGSFCCGNCCSQRCKMFRCT(Nh2)</b>	<b>[free end]&gt;amidation (x1);Pro&gt;Hyp (x1)</b>
4471,6588	4471,638	0,0208	CV8_123_O2	KSSAQSWWDG(Gla)CSGWSVYCTQHTECCSHSCEQEYCTLW	Glu>Gla (x1)
4471,6588	4471,638	0,0208	CV8_124_O2	KSSAQSWWDG(Gla)CSGWSVYCTQHTECCSHSCEQEYCTLW	Glu>Gla (x1)
4528,713	4528,68	0,033	CV8_130_O2	KATAEK(Btr)WDGECISWGYGCAFOWECCSKSCDRYCRMW	Trp>BTr (x1);Pro>Hyp (x1)
4613,8638	4613,928	0,0642	CV8_125_O2	KSTAESWWEGERCTWQAPCNFPSQCCSEVCSSKTHRCLAW(Nh2)	[free end]>amidation (x1)

Peak mass	Peptide mass	Mass error	Peptide name	Peptide sequence	Peptide PTMs
4614,9204	4614,912	0,0084	CV8_125_O2	KSTAESWWEGECRTWQAPCNFPSQCCSEVCSSKTHRCL AW	
4686,3816	4686,459	0,0774	CV8_123_O2	KSSAQS(Btr)(Btr)DG(Gla)CSGWS(hVa)YCTQHT(Gla)CCSH SCEQEY CTLW(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Trp>BTr (x2);Glu>Gla (x2); Val>hVA (x1)
4686,3816	4686,459	0,0774	CV8_124_O2	KSSAQS(Btr)(Btr)DG(Gla)CSGWS(hVa)YCTQHT(Gla)CCSH SCEQEYCTLW(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Trp>BTr (x2);Glu>Gla (x2); Val>hVA (x1)
4711,8024	4711,847	0,0446	CV8_127_O2	(Gla)STF(hVa)K(Btr)WLGKCGIWSSHCYSPATCCSNECSK KTNTCMLY(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Trp>BTr (x1);Glu>Gla (x1); Val>hVA (x1)
4774,4142	4774,437	0,0228	CV8_123_O2	KSSAQS(Btr)(Btr)DG(Gla)CSGWS(hVa)YCTQHT(Gla)CCSH SC(Gla)Q(Gla)YCTLW(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Trp>BTr (x2);Glu>Gla (x4); Val>hVA (x1)
4774,4142	4774,437	0,0228	CV8_124_O2	KSSAQS(Btr)(Btr)DG(Gla)CSGWS(hVa)YCTQHT(Gla)CCSH SC(Gla)Q(Gla)YCTLW(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Trp>BTr (x2);Glu>Gla (x4); Val>hVA (x1)
4837,8834	4837,869	0,0144	CV8_125_O2	KSTA(Gla)SWW(Gla)G(Gla)CRTWQAOCNFOSQCCS(Gla)( hVa)CSS KTHRCLAW(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x2);Glu>Gla (x4); Val>hVA (x1)
4905,1194	4905,075	0,0444	CV8_044_I1	QFDCVDGS(Gla)TCQVNSNCCSFLCCQKTTGKRCAFKRFI GCGDVRI	Glu>Gla (x1)
4980,8283	4980,814	0,0143	CV8_149_Q	DMCDQAGRDCNSRKWCCDDCCERSNCGCKWEYVAGM RFKVCDC	
5369,223	5369,237	0,014	CV8_132_O2	VTDCRQGV(Gla)C(Gla)(Gla)SS(Gla)CCFGLICKDDACEH VSOGPGRALDYRAGPILQ	Pro>Hyp (x1);Glu>Gla (x4)
5468,5404	5468,635	0,0946	CV8_050_I2	IOCHQTGG(Btr)CSTHM(Btr)CCDSRD(hVa)CCDSOSGATC TK(Gla)N(Gla)CS(Btr)P(hVa)IDPF	Trp>BTr (x3);Pro>Hyp (x2); Glu>Gla (x2);Val>hVA (x2)
<b>5742,3972</b>	<b>5742,314</b>	<b>0,0832</b>	<b>CV8_236_Cver 01</b>	<b>TMSNLLNIQTRECOYGCovKCONRNECCDGITCTYIY</b> <b>OGSDYYCIGCGGGGGE(Nh2)</b>	<b>[free end]&gt;amidation (x1);</b> <b>Pro&gt;Hyp (x4)</b>
5892,0786	5892,129	0,0504	CV8_184_Y	QDD(Gla)GSQ(Gla)NAAQR(Gla)LPTTTPCGG(hVa)GDPCD( Gla)PAG(Gla)SCCSRLKC(hVa)S(Gla)RCCPTTDGC	Glu>Gla (x6);Val>hVA (x2)
6753,7122	6753,697	0,0152	CV8_241_Cver 05	D(hVa)YAC(hVa)KKSGSDWVIQRCM(Gla)QS(Gla)CETNC GTHFTCRCEOETVRCOGGAGCFYSSWYTRF	Pro>Hyp (x2);Glu>Gla (x2); Val>hVA (x2)
7377,8832	7377,961	0,0778	CV8_022_Conkunitzin	CFHOLDLGSTCTT(hVa)RIRWYYNQENEMCQTFQYTGC GGNDNNFYT(hVa)DKCKHCCMWDWACOSGP(Nh2)	[free end]>amidation (x1); Pro>Hyp (x2);Val>hVA (x2)

### ANEXO III: Propuesta del TFM.

Las conotoxinas son moléculas peptídicas bioactivas presentes en el veneno segregado por los conos, los cuales son un tipo de gastrópodos marinos de la familia Conidae. El objetivo del presente trabajo es poner a punto un método rápido y fiable para establecer los patrones característicos de los conopéptidos presentes en muestras de la glándula del veneno de individuos de la especie *Lautoconus ventricosus* de la zona del Golfo de Cádiz. Se pretende criar en cautividad ejemplares de esta especie, y comparar sus perfiles venómicos con los de individuos muestreados en estado salvaje. También se realizarán comparaciones entre los extractos de la glándula venenosa con el veneno en sí extraído directamente de los ejemplares. Las técnicas a utilizar serán fundamentalmente cromatografía HPLC/UPLC combinada con espectrometría de masas (MS) y ultravioleta (UV). Se pondrán a punto las condiciones para el aislamiento y posible caracterización de la bioactividad de los componentes más abundantes en el veneno.